



# CREATION ET CARACTERISATION D'UN RAT TRANSGENIQUE, NOUVEAU MODELE DE LA MALADIE DE PARKINSON

Reynald Thinard

## ► To cite this version:

Reynald Thinard. CREATION ET CARACTERISATION D'UN RAT TRANSGENIQUE, NOUVEAU MODELE DE LA MALADIE DE PARKINSON. Neurosciences [q-bio.NC]. 2013. hal-01375851

**HAL Id: hal-01375851**

**<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01375851>**

Submitted on 3 Oct 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

## **MEMOIRE**

**Présenté par Reynald THINARD**

**Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes**

# **CREATION ET CARACTERISATION D'UN RAT TRANSGENIQUE, NOUVEAU MODELE DE LA MALADIE DE PARKINSON**

**Soutenu le 12 Mars 2013 devant le jury suivant :**

*Betty Gardie* – Présidente

*Philippe Naveilhan* – Tuteur scientifique

*Christophe Terzian* – Tuteur pédagogique

*Pascal Derkinderen* – Rapporteur

**Mémoire préparé sous la direction de Philippe Naveilhan**  
INSERM UMR 1064 « immunointervention dans les Allo et Xéno  
transplantations » Directeur : Ignacio Anegón

**Et de Christophe Terzian**  
UMR 754 « Rétrovirus et Pathologie » Directeur : Jean François Mornex  
**EPHE Sciences de la Vie et de la Terre**

**CREATION ET CARACTERISATION D'UN RAT TRANSGENIQUE,  
NOUVEAU MODELE DE LA MALADIE DE PARKINSON**

**Reynald THINARD**

Soutenu le 12 Mars 2013

**RESUME**

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième pathologie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle affecte principalement les neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta conduisant à un dysfonctionnement global des ganglions de la base. Outre les troubles moteurs caractéristiques de la phase symptomatique, les patients présentent un tableau clinique non-moteur durant une phase dite pré-symptomatique davantage prise en compte de nos jours. Même si la pathogénie est mieux comprise, l'ensemble des interactions n'est pas encore totalement défini. Plusieurs facteurs comme le stress oxydatif, l'inflammation ou les dysfonctions mitochondriales sont impliqués dans l'agrégation anormale de protéines, dont une protéine clé : l'alpha-synucléine, retrouvée dans les corps de Lewy qui signent la dégénérescence neuronale. Le diagnostic de la MP étant très tardif par rapport à la perte neuronale et les traitements n'étant que symptomatiques, l'étude de cette pathologie pour une meilleure compréhension et pour le développement de nouveaux axes thérapeutiques nécessite des modèles animaux reproduisant le plus fidèlement possible la physiopathologie de la MP. Les modèles toxiques étant limités, nous avons choisi de développer et de caractériser un nouveau modèle génétique de la MP chez le rat. Ce modèle de rat transgénique, exprimant l' $\alpha$ -syn humaine doublement mutée A30P et A53T, présente différents symptômes tels que l'hyposmie, l'agrégation d'alpha-synucléine et la perte neuronale dopaminergique. Il est donc un bon modèle de la MP dans ces stades précoces et plus particulièrement pour l'étude de la pathologie à son stade pré-symptomatique.

---

**MOTS CLÉS :** Maladie de Parkinson (MP), modèle animal, pré-symptomatique, alpha-synucléine, agrégation, hyposmie, perte neuronale dopaminergique.

# Sommaire

<b><u>Sommaire</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>Abréviations</u></b> .....	<b>3</b>
<b><u>I- Introduction</u></b> .....	<b>5</b>
<u>1- Les maladies neurodégénératives</u> .....	5
<u>2- La maladie de Parkinson</u> .....	5
<u>2.1- Historique</u> .....	5
<u>2.2- Aspects cliniques</u> .....	6
<u>2.2.1- Epidémiologie</u> .....	6
<u>2.2.2- Etiologie</u> .....	7
<u>a. Les facteurs environnementaux</u> .....	7
<u>b. Les facteurs génétiques</u> .....	7
<u>c. Les dysfonctions cellulaires</u> .....	7
<u>d. Les corps de Lewy et les neurites de Lewy</u> .....	7
<u>e. L'alpha-synucléine</u> .....	8
<u>2.3- Les ganglions de la base et la maladie de Parkinson</u> .....	9
<u>2.3.1- Le striatum</u> .....	9
<u>2.3.2- Le pallidum</u> .....	10
<u>2.3.3- La substance noire</u> .....	10
<u>2.3.4- Le noyau sous-thalamique ou corps de Luys</u> .....	11
<u>2.3.5- Organisation fonctionnelle des ganglions de la base et maladie de Parkinson</u> .....	11
<u>2.4- Physiopathologie : la théorie de Braak</u> .....	13
<u>2.5- Les symptômes de la maladie de Parkinson</u> .....	14
<u>2.5.1- symptômes moteurs</u> .....	14
<u>2.5.2- symptômes non moteurs</u> .....	14
<u>a. La démence</u> .....	14
<u>b. L'anxiété et la dépression</u> .....	14
<u>c. Les troubles du sommeil</u> .....	14
<u>d. Les dysfonctions du système nerveux autonome</u> .....	15
<u>e. Les troubles olfactifs : l'hyposmie</u> .....	16
<u>3- Les traitements de la maladie de Parkinson</u> .....	16
<u>3.1- Les traitements pharmacologiques</u> .....	16
<u>3.1.1- Traitements dopaminergiques</u> .....	16
<u>3.1.2- Les anti-cholinergiques</u> .....	17
<u>3.1.3- L'amantadine</u> .....	18
<u>3.1.4- Les traitements des symptômes non moteurs</u> .....	18
<u>3.2- La stimulation cérébrale profonde</u> .....	18
<u>3.3- La thérapie cellulaire</u> .....	19
<u>3.4- Les thérapies complémentaires</u> .....	19
<u>4- Les modèles animaux de la maladie de Parkinson</u> .....	20
<u>4.1- Les modèles neurotoxiques</u> .....	20
<u>4.1.1- Le modèle 6-OHDA</u> .....	20
<u>4.1.2- Le modèle MPTP</u> .....	20
<u>4.1.3- Autres modèles toxiques : les pesticides</u> .....	21

4.2- Les modèles génétiques .....	21
4.2.1- Les modèle de maladie de Parkinson autosomique dominante .....	21
a. Modèles $\alpha$ -syn .....	21
b. Modèles LRRK2 .....	22
c. Modèles Nurr1 .....	23
4.2.2- Les modèle de maladie de Parkinson autosomique récessive .....	23
a. Modèles parkine .....	23
b. Modèles PINK1 .....	24
c. Modèles DJ-1 .....	24
<b>II- Objectifs .....</b>	<b>25</b>
<b>III- Résultats .....</b>	<b>25</b>
1- Création et développement des lignées .....	25
2- Analyse de l'expression de transcrits par PCR quantitative en temps réel .....	27
3- Test des anticorps anti- $\alpha$ -synucléine .....	28
4- Etude des bulbes olfactifs .....	29
4.1- Analyse immunohistochimique .....	29
4.2- Détection d'agrégats protéiques .....	29
4.3- Mesure de la largeur de la zone glomérulaire .....	29
4.4- Comptage des cellules TH-positives dans la zone glomérulaire du BO .....	30
4.5- Analyse de la fonction olfactive des rats .....	30
a. Chez le raton .....	30
b. Chez l'adulte, perception d'une odeur répulsive .....	31
c. Chez l'adulte, perception d'une odeur attractive .....	31
4.6- Analyse de l'expression du transgène par Western blot .....	32
5- Etude de la voie nigro-striée .....	32
5.1- Analyse immunohistochimique .....	32
5.2- Analyse de la neurodégénérescence .....	33
5.3- Etude du comportement neurologique et moteur .....	33
6- Etude des autres structures .....	35
6.1- Le locus coeruleus .....	35
6.2- La zone périventriculaire .....	36
6.3- Le cortex cérébral .....	36
<b>V- Discussion .....</b>	<b>36</b>
La création du modèle .....	37
BO et mise en évidence de l'hyposmie .....	38
Système nigro-strié et troubles moteurs .....	41
LC et troubles du sommeil .....	43
<b>Bibliographie .....</b>	<b>45</b>

## Abréviations

\_syn : alpha-synucléine  
ADNc: ADN complémentaire  
ADNg: ADN génomique  
BO: bulbe olfactif  
BrdU : Bromodeoxyuridine  
Cb : cervelet  
CO : cortex  
COMT : Catéchol-O-Méthyl Transférase  
DNS : sérum normal d'âne  
FMT : faisceau médian du télencéphale  
GABA : acide gamma-aminobutyrique  
GPe : globus pallidus externe  
GPi : globus pallidus interne  
iPS : cellules souches pluripotentes induites  
LB : corps de Lewy  
LC : Locus coeruleus  
L-DOPA: lévodopa  
LN : neurites de Lewy  
MA : maladie d'Alzheimer  
MAO-B : monoamine oxydase B  
MH : maladie de Huntington  
MP : maladie de Parkinson  
NGF: nerve growth factor  
NPP : noyau pédunculo-pontin  
NST : noyau sous-thalamique  
PCR : polymerase chain reaction  
PCRq : PCR quantitative en temps réel  
PFA: paraformaldéhyde  
RBD: rapid-eye movement (REM) behavior disorder  
REM: rapid-eye movement  
RT : rétrotranscription  
SCP : stimulation cérébrale profonde

SN : substance noire  
SNC : système nerveux central  
SNpc : substance noire pars compacta  
SNpr : substance noire pars reticulata  
SNE: système nerveux entérique  
SNr : substance noire pars reticulata  
SPD: Sprague-Dawley  
STPO : streptavidine peroxydase  
Stri : striatum  
SVZ : zone sous ventriculaire  
TG : transgénique  
TH : tyrosine-hydroxylase  
UPS : système ubiquitine-protéasome  
VTA : aire tegmentale ventrale  
WT : témoin sauvage

# **I- Introduction**

## **1- Les maladies neurodégénératives**

Les maladies neurodégénératives constituent un groupe hétérogène de pathologies liées à un dysfonctionnement métabolique au sein du système nerveux central conduisant à la perte progressive de certaines populations neuronales.

Le cerveau et la moelle épinière peuvent être touchés par des lésions diffuses ou limitées à certaines zones spécifiques. Les plus communes sont les maladies d'Alzheimer (MA), de Parkinson (MP) ou encore la maladie de Huntington (MH). La mort d'une population neuronale va entraîner le dysfonctionnement d'une fonction cérébrale telle que, par exemple, la mémoire dans la MA, la motricité dans la MP ou encore la motricité ou la cognition dans la MH. Les prévalences de ces pathologies dans la population générale sont respectivement de 4-5 %, 1-2 ‰ et 3-7 ‰ ce qui représente environ 1 million de patients en France. La prévalence atteint 20% de la population des plus de 80 ans pour la MA. Il existe pour la plupart, des formes sporadiques et génétiques voir une étiologie plus complexe basée sur une susceptibilité génétique et l'exposition à divers facteurs environnementaux. De plus, aucun traitement curatif n'existe encore pour l'ensemble de ces pathologies, les patients ne disposant que de traitements symptomatiques. Les traitements pharmacologiques sont limités par des contraintes spécifiques au système nerveux central telles que le passage de la barrière hémato-encéphalique mais aussi la méconnaissance actuelle de tous les mécanismes mis en jeu et leur complexité. Ces maladies sont donc un enjeu économique et social très important et représentent un défi pour la recherche médicale. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont envisagées et nécessitent le développement de modèles animaux les plus proches possibles des pathologies humaines.

Nous nous intéresserons particulièrement à l'une de ces pathologies : la MP.

## **2- La maladie de Parkinson**

### **2.1- Historique**

La MP a été décrite pour la première fois en 1817 par Sir James Parkinson (1755-1824), chirurgien anglais, dans sa publication intitulée « An essay on the shaking palsy ». Il décrit des patients présentant des tremblements involontaires des membres au repos, une tendance à courber le dos et une diminution de la force motrice. Des descriptions antérieures



ont été retrouvées dans des écrits de médecine indienne datant de plus de 3000 ans, décrivant un syndrome caractérisé par des tremblements et une akinésie. Une plante appelée *Mucuna Pruriens* (Pois mascate) contenant de la lévodopa (Manyam, 1990; Katzenschlager et al., 2004), était administrée à ces patients. Les médecins français Armand Trousseau et Jean-Martin Charcot font considérablement avancer les connaissances sur la MP dans les années 1870. Puis, sont apparus les concepts de bradykinésie avec Cruchet en 1921, et d'akinésie avec Samuel Alexander Kinnier Wilson en 1925. Enfin, en 1967, Martin propose une nouvelle définition de la MP reposant sur les symptômes moteurs. Au cours du XX<sup>ème</sup> siècle, les recherches cellulaires et moléculaires de la MP vont se développer. Ainsi, en 1912, Frédéric Lewy décrit des corps intra-cytoplasmiques (Harrower et al., 2005) qui seront par la suite appelés corps de Lewy et seront mis en évidence dans les neurones restants de la substance noire (SN) de patients décédés de la MP. Dans les années 1950, un scientifique Suédois, Arvid Carlsson, montre que la dopamine est un neuromédiateur et que son taux est particulièrement élevé dans les ganglions de la base, structures essentielles dans le contrôle des mouvements. Les travaux de Hornykiewicz, dans les années 1960, ont permis de montrer une baisse du taux de dopamine dans la SN et le striatum des patients (Hornykiewicz, 1966). En 1979, le premier cas de syndrome parkinsonien juvénile est observé chez un étudiant californien après une injection d'héroïne contaminée par un neurotoxique, la 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP ; Langston et Ballard, 1983).

## 2.2- Aspects cliniques

### 2.2.1- Epidémiologie

La MP est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer (Schapira, 1999). La MP touche environ 5 millions de personnes à travers le monde (Chen, 2010). Sa fréquence est 1,5 fois plus élevée chez les hommes que chez les femmes (Lees et al., 2009). Elle débute en générale entre 55 et 65 ans. Il existe cependant des formes plus précoces qui peuvent apparaître entre 20 et 40 ans, ces formes sont rares mais plus sévères. Dans la population générale des pays industrialisés, on constate de grandes variations de la prévalence ce qui pourrait s'expliquer par des différences d'exposition à des facteurs environnementaux ainsi qu'à des susceptibilités génétiques différentes selon les populations (De Lau et Breteler, 2006). De nos jours, les causes de la MP ne sont pas encore totalement établies.

## 2.2.2- Etiologie

### a. Les facteurs environnementaux

Dans 90% des cas, la MP est sporadique et serait due à des facteurs environnementaux associés à une susceptibilité génétique. La plupart des molécules incriminées sont des pesticides. Ils regroupent les insecticides, les molluscicides, les rongicides, les herbicides et les fongicides (Dick, 2006). Certains métaux (Manganèse, Fer) sont aussi suspectés d'être à l'origine du processus pathologique de la MP.

### b. Les facteurs génétiques

Dans environ 10% des cas, la MP a une origine génétique. En effet, de nombreux loci ont été découverts comme y étant associés. Ces gènes mis en cause dans la MP sont regroupés sous le terme PARK (PARK 1 à PARK 15). Certains codent pour une maladie autosomique dominante alors que d'autres sont responsables de formes autosomiques récessives.

### c. Les dysfonctions cellulaires

La principale caractéristique neuropathologique de la MP est la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNpc) (Olanow et al., 2009) provoquant une diminution du taux de dopamine dans le striatum.

Différents paramètres semblent être impliqués dans cette dégénérescence: le stress oxydatif, la formation de radicaux libres, une dysfonction mitochondriale, une excitotoxicité glutamatergique, un phénomène inflammatoire et une défaillance du système ubiquitine-protéasome (UPS). De plus, la présence d'agrégation de formes anormales d'une protéine pré-synaptique: l'alpha-synucléine ( $\alpha$ -syn) jouerait un rôle clé dans la pathologie et serait impliquée dans l'ensemble de ces paramètres. Au niveau histopathologie, la MP est caractérisée par la présence d'inclusions cytoplasmiques appelées corps de Lewy (LB, Lewy body) et par la présence de neurites de Lewy (LN, Lewy neurites).

### d. Les corps de Lewy et les neurites de Lewy

Les LB sont des inclusions intracytoplasmiques neuronales sphériques de 5 à 25  $\mu$ m de diamètre (Dawson et al, 2000). Elles contiennent différentes protéines comme l'ubiquitine, la synphilin-1, la tubuline mais la protéine majoritaire de ces inclusions est l' $\alpha$ -syn (Braak et al., 2004; Branco et al., 2010). De la même manière que les LB, les LN sont composés d'agrégats protéiques et notamment d' $\alpha$ -syn. Deux hypothèses s'opposent en ce qui concerne

le rôle des LB. Pour les uns, ces inclusions sont toxiques et participent à la mort cellulaire. Pour d'autres, au contraire, les LB sont neuroprotecteurs (Agid, 1991 ; Agid et al., 1993 ; Langston, 1996).

#### e. L'alpha-synucléine

L'accumulation anormale d' $\alpha$ -syn dans les neurones est aujourd'hui considérée comme un événement pathogénique majeur dans la MP. En effet, en plus de sa présence majoritaire dans les LB, trois mutations : A53T (Polymeropoulos et al., 1997), A30P (Kruger et al., 1998) et E46K (Zarranz et al., 2004) ont été retrouvées associées à une forme héréditaire à transmission autosomique dominante de la pathologie chez des familles de patients. La duplication ou triplication du gène codant l' $\alpha$ -syn entraîne aussi une MP autosomique dominante (Singleton et al., 2003).

L' $\alpha$ -syn est une petite phosphoprotéine neuronale de 18 à 20 kDa codée par le gène SNCA situé sur le chromosome 4q21. Elle est majoritairement concentrée au niveau synaptique dans le néocortex, l'hippocampe, l'amygdale, les bulbes olfactifs (BO), le thalamus, le striatum mais sa plus forte concentration est observée dans la SNpc.

Elle serait impliquée dans la régulation de la fonction synaptique et dans la régulation de la taille vésiculaire. L' $\alpha$ -syn est capable d'inhiber l'exocytose de la dopamine, de moduler l'activation de la tyrosine-hydroxylase (TH, enzyme limitante de la synthèse de la dopamine depuis la tyrosine) et de down-réguler l'activité du transporteur vésiculaire nécessaire à l'entrée de la dopamine dans les vésicules. D'autre part, l' $\alpha$ -syn pourrait être impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique. En effet, cette protéine augmenterait l'entrée du calcium via les canaux calciques de type L. Enfin, il semble que l' $\alpha$ -syn interagisse avec la tubuline, en effet, elle participe à la modulation de la dynamique microtubulaire dans les neurones en inhibant cette formation microtubulaire. Il a été montré qu'une surexpression d' $\alpha$ -syn entraîne une défaillance du réseau microtubulaire et du trafic qui en dépend (Branco et al., 2010).

Ainsi, l'ensemble des dysfonctionnements cellulaires aboutit à une dégénérescence neuronale en particulier dans la SNpc et le striatum, structures principales touchées dans la MP. Cependant, ces deux structures appartiennent à des structures neuroanatomiques appelées noyaux gris centraux ou ganglions de la base. Les signes moteurs résultent donc d'une interaction complexe entre ces ganglions de la base d'une part et d'autres structures cérébrales

d'autre part. Outre ces perturbations motrices, le patient parkinsonien est affecté par des troubles non moteurs davantage pris en considération de nos jours et qui pourraient se révéler être une clé pour un diagnostic précoce de la maladie.

## **2.3- Les ganglions de la base et la maladie de Parkinson**

Les troubles moteurs de la MP sont liés à un dysfonctionnement des ganglions de la base (ou noyaux gris centraux) qui correspondent à un ensemble de noyaux de la substance grise située au milieu du cerveau. Cependant, les ganglions de la base sont également impliqués dans la cognition, la mémoire, le comportement social ou encore les émotions. Les ganglions de la base sont composés de différentes structures cérébrales que sont le striatum (le noyau caudé et le putamen), le pallidum (le globus pallidus interne (GPi) et externe (GPe)), le thalamus ainsi que deux autres noyaux fonctionnellement reliés, la SN et le noyau sous-thalamique (NST). L'information provenant de la majorité des régions du cortex suit la voie d'entrée des ganglions de la base, via le striatum et le noyau sous-thalamique, et ressort via le GPi et la Substance noire pars reticulata (SNpr), pour enfin être reconduite au cortex via le thalamus (Obeso et al., 2000; Lewis et Barker, 2009).

### **2.3.1- Le striatum**

Le striatum est une structure fortement impliquée dans le contrôle des mouvements. Il est composé du noyau caudé et du putamen et constitue la principale voie d'entrée dans le circuit des ganglions de la base. Il reçoit diverses afférences de la quasi-totalité de cerveau. Il est innervé par le cortex sensori-moteur dans l'élaboration du programme moteur. Le noyau caudé est innervé par les aires associatives temporo-pariéto-occipitales qui apportent des informations nécessaires à l'adaptation du programme moteur à l'environnement.

Par ailleurs, le striatum reçoit des afférences thalamiques des informations proprioceptives inconscientes nécessaires à l'adaptation du programme moteur en fonction de la situation des membres dans l'espace. Enfin, le striatum reçoit des afférences de la SN constituant la voie nigro-striée.

Le striatum va inhiber le pallidum via les neurones GABAergiques (GABA : Acide Gamma-aminobutyrique). Le striatum est un centre intégrateur qui permet d'élaborer la composante spatiale du programme moteur. Une lésion de cette structure est responsable d'une akinésie.

### 2.3.2- Le pallidum

Le pallidum est constitué de deux unités fonctionnelles distinctes : le globus pallidus externe (GPe) et le globus pallidus interne (GPi). C'est un centre effecteur du cerveau qui reçoit des afférences du striatum et des NST (corps de Luys), et qui innerve le thalamus, la formation réticulée et le noyau rouge. L'ensemble des voies efférentes forme le faisceau lenticulaire pallidal. Tout d'abord, le thalamus (noyau extrapyramidal ventro-latéral-anérieur) se projette sur le cortex pré-moteur frontal, assurant ainsi la transmission du programme moteur. D'autre part, la formation réticulée, structure du tronc cérébral à l'interface de systèmes autonome, moteur et sensitif, intervient dans la régulation de grandes fonctions vitales (comme les cycles veille-sommeil), dans le contrôle des activités motrices réflexes ou stéréotypées (comme la marche, le tonus postural) et dans des fonctions cognitives (comme l'attention). La troisième structure innervée par le pallidum est le noyau rouge. C'est une structure sous-corticale située dans le tegmentum du mésencéphale, où est aussi localisée la SN. Le noyau rouge constitue l'un des relais des voies extrapyramidales.

La motricité est sous le contrôle de deux systèmes : le système moteur extrapyramidal et le système moteur pyramidal (Harrison, 1992). Le système moteur extrapyramidal regroupe l'ensemble des circuits responsables de la motricité involontaire, notamment réflexe, et du contrôle de la posture. Le système moteur pyramidal contrôle les mouvements volontaires et prend naissance au niveau du cortex moteur primaire.

Le pallidum exerce une action inhibitrice sur la formation réticulée inhibant les réflexes médullaires de posture. Il a donc une action modératrice du tonus. Le pallidum est ainsi le centre effecteur communiquant au cortex pré-moteur le programme moteur élaboré au niveau striatal. De plus, il enrichi ce programme d'une composante semi-automatique proximale qui accompagne tout geste volontaire. Enfin, en contrôlant les voies extrapyramidales impliquées dans le mouvement par l'intermédiaire de ses efférences vers la formation réticulée et le noyau rouge, il modère le tonus des muscles concernés pour qu'ils puissent participer au geste.

### 2.3.3- La substance noire

La SN est une structure nerveuse localisée dans la partie rostrale du mésencéphale et qui n'appartient pas strictement aux ganglions de la base, bien qu'elle y soit richement

interconnectée. Le nom de cette structure est dû à la présence du pigment neuro-mélanine au sein des neurones la constituant, lui donnant un aspect foncé ou noir.

La SN est composée de deux couches distinctes : une *pars reticulata*, ventrale, et une *pars compacta*, dorsale. La SNpr contient des neurones GABAergiques dont les axones se projettent en majorité sur le thalamus. La SNpc contient des neurones dopaminergiques dont les axones gagnent le striatum pour former la voie nigro-striée (Delmas, 1970; Cambier, 1972; Harrison, 1992).

#### 2.3.4- Le noyau sous-thalamique ou corps de Luys

Comme son nom l'indique le NST est situé sous le thalamus. Il reçoit des afférences excitatrices du cortex cérébral et des afférences inhibitrices du GPe. Il envoie des efférences excitatrices dans le GPe et le GPi (boucle de rétrocontrôle), dans la SNpc et la SNpr, ainsi que dans le noyau pédonculo-pontin (NPP). Ce NST exerce un rôle majeur dans le contrôle de la motricité. En effet, il constitue la dernière structure de ce qui est appelé la voie indirecte des ganglions de la base.

#### 2.3.5- Organisation fonctionnelle des ganglions de la base et maladie de Parkinson.

Les ganglions de la base forment un réseau complexe de boucles parallèles qui intègrent les informations de différentes régions cérébrales (associative, oculomotrice, limbique et motrice).

Tout d'abord, les neurones des aires corticales motrices et pré-motrices se projettent dans le putamen postéro-latéral où elles établissent des connections excitatrices (glutamatergiques) avec les neurones GABAergiques du striatum. Depuis le striatum, deux voies, l'une directe et l'autre indirecte, prennent naissance.

**Dans la voie directe**, les neurones GABAergiques du putamen, qui portent les récepteurs dopaminergiques de type 1 (D1), se projettent directement dans le GPi et la SNpr : (striatum – GPi/SNpr).

**Dans la voie indirecte**, les neurones GABAergiques du putamen, qui portent les récepteurs dopaminergiques de type (D2), sont connectés au GPe. Le GPe exerce à son tour un tonus inhibiteur GABAergique sur le NST. Ce dernier envoie des projections glutamatergiques (excitatrices) dans le GPi/SNpr : (striatum – GPe – NST – GPi/SNpr). Enfin, le GPi et la

SNpr sont connectés par des neurones GABAergiques au thalamus et au NPP. Les fibres nerveuses, partant du thalamus pour arriver dans le cortex préfrontal et moteur, sont de nature glutamatergique. Le NPP qui est le noyau le plus important du tronc cérébral impliqué dans la locomotion, active les générateurs centraux du rythme, dans la moelle épinière (Obeso et al., 2000; Lewis et Barker, 2009).

Dans ce modèle, la nature des récepteurs dopaminergiques portés par les neurones GABAergiques du striatum, joue un rôle déterminant. En effet, les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 exercent des effets opposés : le récepteur D1 est activateur alors que le récepteur D2 est inhibiteur. Ainsi, dans la voie directe (Lewis et Barker, 2009), les neurones GABAergiques du striatum, qui portent le récepteur D1 (excitateur) et qui sont activés par les neurones dopaminergiques de la SNpc, vont exercer un effet inhibiteur sur les neurones du GPi/SNpr. Cet effet inhibiteur sur le GPi/SNpr va entraîner une réduction du tonus inhibiteur sur le thalamus et le NPP favorisant la transmission excitatrice vers le cortex. Donc au final, la voie directe exerce une activité excitatrice sur la motricité. Dans la voie indirecte (Lewis et Barker, 2009), le striatum est connecté au GPe via des neurones GABAergiques qui exercent un effet inhibiteur sur le GPe. Ces neurones GABAergiques, portent des récepteurs D2, qui sont activés par les neurones dopaminergiques de la SNpc. Donc, une activation de ces récepteurs D2 va entraîner une moindre inhibition du GPe. Ce dernier va ainsi davantage inhiber le NST qui lui-même va entraîner une moindre activation du GPi/SNpr. Une activité réduite du GPi/SNpr va permettre une moindre inhibition (donc une activation) du thalamus et du NPP. La transmission excitatrice du thalamus vers le cortex est alors facilitée. La voie indirecte exerce aussi une activité excitatrice sur la transmission motrice. Cependant, dans le cas où les récepteurs D2 sont nettement moins stimulés, la voie indirecte devient alors une voie inhibitrice de la motricité. Ainsi, une régulation fine de la sécrétion de dopamine au sein du striatum est, selon ce modèle, impliquée dans le contrôle de la motricité (Lewis et Barker, 2009).

Dans le cas de la MP, (Lewis et Barker, 2009), la déplétion dopaminergique du striatum, conséquence de la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc, entraîne une perte de l'équilibre naturel de la boucle motrice. Cette perte de stimulation dopaminergique a pour conséquence une hyperactivation des noyaux GPi et SNpr entraînant une forte inhibition du thalamus et du NPP.

En effet, dans la voie directe, la perte de la stimulation des récepteurs D1 portés par les neurones GABAergiques du striatum, entraîne une désinhibition (donc une plus forte activation) du GPi/SNpr.

Dans la voie indirecte, la perte de la stimulation des récepteurs D2 portés par les neurones GABAergiques du striatum, entraîne une hyperinhibition du GPe et donc une hyperactivation du NST et du GPi/SNpr, et par conséquent, une hyperinhibition de la voie thalamo-corticale et du NPP. Au final, cette inhibition excessive conduit aux troubles moteurs parkinsoniens et principalement à l'akinésie (Lewis et Barker, 2009).

Enfin, les émotions et la motivation sont des paramètres qui peuvent influencer le contrôle de la motricité. On sait, par exemple, que le tremblement de repos est aggravé par des situations stressantes ou émotionnellement fortes. En effet, certaines structures communes aux ganglions de la base sont également impliquées dans les circuits neuronaux limbiques et aussi cognitifs (Lewis et Barker, 2009). Les noyaux sont divisés en différents territoires (moteur, associatif, limbique) assurant une organisation somatotopique des projections des différentes régions corticales (Rodriguez-Oroz et al., 2009).

## **2.4- Physiopathologie : la théorie de Braak**

De nombreuses observations neuroanatomiques ont permis de suggérer un développement progressif de la MP depuis les ganglions de la base jusqu'à l'ensemble du cortex. Le processus pathologique conduisant au développement de la MP est lent et progressif (Braak et al., 2004). Au début, lors de la phase dite présymptomatique, car sans manifestation de troubles moteurs, les inclusions intraneuronales sont localisées à seulement quelques structures cérébrales. Cependant, dans les phases terminales de la maladie, dans lesquelles on retrouve de forts troubles moteurs mais aussi de nombreux troubles non-moteurs, les LB et les LN se sont étendus à la quasi-totalité de l'ensemble du cortex. Afin d'expliquer l'atteinte progressive de différentes structures cérébrales dans le développement et l'évolution de la MP, H. Braak et son équipe ont émis, depuis 1996, une proposition d'évolution de la maladie en six stades (Braak et al., 2004) fondée sur les observations histopathologiques.

Cette théorie permet d'expliquer l'apparition de symptômes moteurs ainsi que leur chronologie selon la progression de l'atteinte des zones cérébrales. De la même façon, ces



zones cérébrales touchées participent à la physiopathologie des troubles non moteurs de la MP. De même d'un point de vu plus global, lors de l'atteinte de zones périphériques comme le système nerveux entérique par exemple.

## **2.5- Les symptômes de la maladie de Parkinson**

### **2.5.1- symptômes moteurs**

La baisse du taux de dopamine dans le striatum va provoquer les symptômes caractéristiques de la MP que sont l'akinésie (inhibition de l'initiation des mouvements), les tremblements de repos, l'hypertonie et l'instabilité posturale (Steece-Collier et al, 2002 ; Kotzbauer et al, 2004 ; Maguire-Zeiss et al, 2004). Ces symptômes sont en général asymétriques et apparaissent lorsque 70 à 80 % des neurones dopaminergiques de la SNpc sont morts (Schapira et al., 1999). L'ensemble de ces symptômes moteurs affectent la statique et la marche du patient parkinsonien. En effet, dans les formes évoluées, les patients prennent une posture penchée en avant, les genoux légèrement fléchis, les coudes près du corps avec les avant-bras demi-fléchis.

### **2.5.2- symptômes non moteurs**

#### **a. La démence**

Le système cholinergique du prosencéphale basal est impliqué dans la démence de la MP (Dickson et al., 2009). Elle serait en grande partie due à une perte neuronale de 60 à 80% dans le noyau basal de Meynert chez les patients parkinsoniens (Ziemssen et Reichmann, 2007).

#### **b. L'anxiété et la dépression**

La dépression peut toucher jusqu'à 45% des patients parkinsoniens (Chaudhuri et Schapira, 2009). Les états d'anxiété et de dépression dans la MP sont corrélés à une dégénérescence des neurones noradrénergiques du locus coeruleus et des neurones sérotoninergiques du raphé. Leur atteinte précoce d'après le schéma d'évolution de Braak, pourrait expliquer pourquoi les états d'anxiété et de dépression se manifestent avant l'apparition des signes moteurs (Dickson et al., 2009).

#### **c. Les troubles du sommeil**

Les troubles du sommeil touchent 60 à 98% des patients parkinsoniens. On note principalement l'insomnie et le syndrome des mouvements oculaires rapides (rapid-eye

movement (REM) behavior disorder (RBD) qui correspond à une perte de l'atonie musculaire normale pendant les phases de sommeil de mouvements oculaires rapides (REM). Le patient peut alors transposer physiquement ses rêves et cauchemars. Le diagnostic d'une RBD annonce le début des signes moteurs d'une MP chez 40% des patients (Ziemssen et Reichmann, 2007). Cette RBD est aussi l'un des troubles non-moteurs qui peut apparaître plusieurs années avant le début des signes moteurs (Ziemssen et Reichmann, 2007; Chaudhuri et Schapira, 2009). Il aurait pour origine une dégénérescence des noyaux du tronc cérébral (stade 2 de Braak ; Ziemssen et Reichmann, 2007; Dickson et al., 2009; Wolters, 2009).

#### d. Les dysfonctions du système nerveux autonome

Les quatre principaux troubles du système nerveux autonome dans la MP sont les troubles cardio-vasculaires, gastro-intestinaux, uro-génitaux et de thermorégulation (hyperhidrose).

##### *- Les dysfonctions cardiovasculaires.*

Les troubles cardiovasculaires des patients parkinsoniens proviennent d'une réduction de l'efficacité cardiaque qui entraîne des troubles du rythme cardiaque, des troubles baroréflexes et une hypotension orthostatique (Wolters, 2009).

##### *- Les dysfonctions uro-génitales.*

Les symptômes sont des problèmes de rétention urinaire et de vidange vésicale, ils sont attribués à un défaut de dopamine entraînant une désinhibition et une hyper activation du réflexe de miction (Wolters, 2009).

##### *- Les dysfonctions gastro-intestinales.*

Le système nerveux entérique (SNE) est constitué d'un réseau neuronal intégratif organisé en deux plexus ganglionnaires. Le contrôle de ses fonctions est largement indépendant de l'influence du système nerveux central. C'est ainsi que le SNE est qualifié de « second cerveau » (Lebouvier et al., 2009). Les lésions dans le SNE apparaissent dans les premiers stades de la maladie avec des symptômes plusieurs années avant l'apparition des troubles moteurs (Wolters, 2009) or des facteurs environnementaux seraient impliqués dans le développement de la MP et le SNE (comme le système olfactif) pourrait être une voie d'entrée d'agents toxiques dans le SNC (Hawkes et al., 2009). Ainsi, ces lésions pourraient jouer un rôle central dans la physiopathologie de la maladie.

#### e. Les troubles olfactifs : l'hyposmie

Le système olfactif est en contact permanent avec des substances potentiellement toxiques. L'hyposmie observée chez les patients parkinsoniens se manifeste plusieurs années avant l'apparition des troubles moteurs (Tolosa et al., 2007). Ainsi, Braak et al. a émis l'hypothèse que le système olfactif serait une porte d'entrée à des facteurs environnementaux toxiques et que les bulbes olfactifs pourraient être parmi les premières structures atteintes par les corps de Lewy (Braak et al., 2004; Hawkes et al., 2009). Bien que les neurones dopaminergiques de la substance noire dégénèrent, Huisman et son équipe, ont montré une augmentation de 100% du nombre de neurones dopaminergiques dans les bulbes olfactifs (Huisman et al., 2004). Or, la dopamine exerce un effet inhibiteur entre les axones des neurones récepteurs olfactifs et les dendrites des cellules mitrales des bulbes olfactifs (Huisman et al., 2004) entraînant au final une diminution de la transmission olfactive. Ainsi, cette augmentation du nombre de neurones dopaminergiques périglomérulaires pourrait expliquer l'hyposmie retrouvée chez les patients parkinsoniens.

### **3- Les traitements de la maladie de Parkinson**

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif de la MP. Les traitements sont uniquement symptomatiques visant à corriger les symptômes moteurs et non moteurs afin d'améliorer le vécu du malade. Il existe plusieurs types de traitements : les traitements pharmacologiques, les traitements chirurgicaux et la prise en charge non médicamenteuse.

#### **3.1- Les traitements pharmacologiques**

##### **3.1.1- Traitements dopaminergiques**

La lévodopa (L-DOPA) est actuellement la molécule la plus efficace contre les troubles moteurs de la MP. Son administration va compenser la diminution de dopamine induite par la déficience dopaminergique et ainsi améliorer les symptômes moteurs. Les patients traités avec la L-DOPA présentent une période d'embellie appelée « lune de miel » qui dure quelques années, en moyenne 8 (Cotzias et al., 1969).

La L-DOPA qui peut traverser la barrière hémato-encéphalique, est transformée, en particulier par les neurones de la voie nigro-striée, en dopamine par une décarboxylase. Une fois absorbée, elle est rapidement décarboxylée mais une petite portion de la dose uniquement

a entrer dans le système nerveux central. En périphérie, l'administration de L-DOPA et sa transformation en dopamine va engendrer des effets secondaires tels que des nausées et de l'hypertension artérielle. Ce traitement est donc, en général, couplé à un inhibiteur de la décarboxylase périphérique (carbidopa ou benserazide) qui ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique. Ceci permet de diminuer les effets secondaires dus à sa transformation en périphérie tout en augmentant par 10 la disponibilité de la L-DOPA au niveau du système nerveux central.

La L-DOPA réduit les troubles moteurs de la MP mais n'affecte pas les symptômes non moteurs (Cools et al. 2006). Mais après quelques années de traitement, l'organisme est de moins en moins sensible et des complications motrices peuvent survenir telles que des dyskinésies ou des fluctuations motrices (effet « on-off ») qui peuvent être plus handicapantes que la maladie elle-même (Damier et al., 2002 ; Derkinderen et al., 2002). Les dyskinésies vont apparaître chez 30 à 50 % des patients après 5 ans de traitement et chez 90 % des patients après 10 ans. Les principaux facteurs de survenue des dyskinésies sont un âge de début de la maladie précoce, une dénervation dopaminergique nigrostriatale importante, la durée du traitement et l'augmentation de la dose de L-DOPA (Fahn et al., 2000).

D'autres médicaments ont été développés pour prolonger l'effet thérapeutique de la L-DOPA en inhibant les enzymes participant à sa dégradation. L'utilisation des inhibiteurs de la MAO va permettre de réduire les symptômes en inhibant la dégradation de la dopamine sécrétée par les neurones. Les inhibiteurs de la Catéchol-O-Méthyl Transférase (COMT) sont actuellement développés. Ils agissent essentiellement au niveau périphérique (tube digestif, foie et plasma), en inhibant la transformation par la COMT de la L-DOPA en 3-O-méthyl-dopa (3-OMD), un métabolite inactif présumé antagoniser la pénétration de la L-DOPA dans le cerveau.

Des agonistes dopaminergiques peuvent aussi être utilisés. Ils vont mimer l'effet de la dopamine en stimulant les récepteurs dopaminergiques. Leur activité pharmacologique est indépendante du stock de neurones dopaminergiques fonctionnels puisqu'ils agissent directement sur les récepteurs post-synaptiques qui restent en partie préservés au cours de la maladie cependant ce type de traitement entraîne progressivement une baisse de sensibilité des récepteurs dopaminergiques, les symptômes pouvant alors augmenter.

### 3.1.2- Les anti-cholinergiques

L'utilisation des médicaments anti-cholinergiques muscariniques a pour but de diminuer l'excès relatif d'acétylcholine dans le striatum afin d'équilibrer les taux de dopamine et d'acétylcholine pour retrouver un fonctionnement normal des ganglions de la base. Leur action centrale anti-parkinsonienne est surtout efficace sur le tremblement de repos, moins sur l'hypertonie et quasiment nulle sur l'akinésie (Olanow et al., 2009). Actuellement, ils ne sont que très peu utilisés en raison du fort risque d'effets indésirables.

### **3.1.3- L'amantadine**

L'amantadine est un composé antiviral qui a également des propriétés pharmacologiques anti-parkinsoniennes. Elle augmente la libération de dopamine, bloque la recapture de la dopamine et stimule les récepteurs dopaminergiques. C'est aussi un antagoniste des récepteurs N-méthyl-D-aspartate, elle agit sur l'ensemble des fonctions motrices (Olanow et al., 2009).

### **3.1.4- Les traitements des symptômes non moteurs**

Les médecins disposent à l'heure actuelle d'une pharmacopée très large afin de traiter et soulager les patients des symptômes non moteurs liés à la MP comme les troubles cardiaques, digestifs, cognitifs ou encore les troubles du sommeil.

## **3.2- La stimulation cérébrale profonde**

La stimulation cérébrale profonde (SCP) est une électrostimulation à haute fréquence du noyau sous thalamique (Limousin et al., 1995 ; Pollak et al., 1996 ; Krack et al., 1997) au moyen d'un stimulateur placé sous la peau au niveau du thorax qui envoie des impulsions électriques. Elle agit sur les dysfonctionnements situés en aval de la dénervation et permet ainsi d'obtenir une nette amélioration de l'état de santé du patient sans pour autant stopper l'évolution de la maladie (Blond et al., 1992 ; Tasker et al., 1997).

L'efficacité de cette chirurgie fonctionnelle est très bonne chez la majorité des patients opérés ces dernières années. Elle permet dans de nombreux cas de diminuer les doses de L-DOPA voir stopper sa prise et donc d'atténuer considérablement les effets secondaires liés à la médication. Cependant, cette opération n'est réalisable que chez 5 à 10 % des

patients (Limousin et al., 1997 ; Bejjani et al., 1999) étant généralement recommandée aux patients dans les tous premiers stades de la maladie.

### 3.3- La thérapie cellulaire

Après une tentative décevante d'autogreffes de surrénales par Madrazo à la fin des années 80 (Madrazo et al., 1987) et les travaux de Dunnett chez l'animal (Dunnett et al., 1991), des greffes de neuroblastes foetaux ont été tentées chez l'homme (Peschanski et al., 1994 ; Kordower et al., 1995). L'allogreffe de neuroblastes foetaux a pour objectif de remplacer les neurones dopaminergiques dégénérés chez les patients. Les greffes sont réalisées avec des neuroblastes foetaux à un stade très peu différencié et provenant du mésencéphale ventral. Les résultats cliniques publiés montrent une nette amélioration de l'état de santé des patients au cours du temps. La survie et de l'intégration du greffon dans le parenchyme striatal ont été démontrées lors d'analyses post mortem (Kordower et al., 1995). Cependant, cette technique pose des problèmes de logistique (liés au nombre important de fœtus nécessaires pour greffer un patient) et d'éthique (liés à l'utilisation de fœtus humains). De plus, l'apparition d'effets secondaires (dyskinésies) chez des patients greffés a stoppé les essais (Freed et al., 2001). Cependant, une nouvelle alternative à ces greffes et à leurs limites est apparue ces dernières années avec l'isolement et l'étude des cellules souches embryonnaires et plus particulièrement des cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS). En effet, ce sont des cellules souches pluripotentes dont on dirige la différenciation afin d'obtenir le type cellulaire et le phénotype désiré. Elles constituent une source de cellule prometteuse pour la médecine régénérative dans de nombreuses pathologies en particulier les maladies neurodégénératives. En 2011, l'équipe de Lorenz Studer arrivait à greffer des neurones mésencéphaliques dérivés de cellules souches embryonnaires humaines dans 3 espèces différentes de modèles parkinsoniens. Les neurones greffés se sont intégrés avec un profil moléculaire, biochimique et électrophysiologique caractéristique des neurones dopaminergiques et aboutissant à une récupération fonctionnelle. Ce qui est une grande avancée et crée de grandes perspectives pour la thérapie cellulaire (Kriks et al., 2011).

### 3.4- Les thérapies complémentaires

En ajout du traitement pharmacologique et/ou chirurgical, d'autres thérapies peuvent être ajoutées au projet thérapeutique comme de la rééducation du patient, du maintien de

l'activité physique (kinésithérapie, ergothérapie) ou encore de la diététique cela dans le but d'optimiser l'efficacité du traitement « principal » et d'améliorer le quotidien du patient.

## 4- Les modèles animaux de la maladie de Parkinson

Afin d'étudier et de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans la MP, différents modèles animaux ont été créés. Il existe des modèles neurotoxiques et génétiques.

### 4.1- Les modèles neurotoxiques

#### 4.1.1- Le modèle 6-OHDA

La 6-OHDA est la neurotoxine la plus couramment utilisée pour générer des modèles d'étude de la MP *in vitro* et *in vivo* (Ungerstedt et al., 1968 et 1976 ; Sachs et al., 1975 ; Blum et al., 2001). Il s'agit d'une toxine spécifique des neurones catécholaminergiques (Betarbet et al., 2002) étant captée par les transporteurs dopaminergiques et noradrénergiques (Luthman et al., 1989). Au niveau cellulaire, la toxine va être oxydée générant des radicaux libres et inhibant le complexe I mitochondrial induisant la mort cellulaire par apoptose, ce qui va entraîner la mort sélective des neurones dopaminergiques de la zone ciblée de façon relativement spécifique. La mort des neurones dopaminergiques très rapide (intervenant dès 3-4j) est suivie par la dégénérescence des fibres dopaminergiques du striatum et donc la diminution du taux de dopamine dans le striatum. Cette toxine ne pouvant passer la barrière hémato-encéphalique, son administration se fait par injection stéréotaxique intracérébrale. Les sites d'injection les plus fréquemment utilisés sont la SN, le faisceau médian du télencéphale (FMT) ou le striatum (Javoy et al., 1976 ; Jonsson et al., 1982).

#### 4.1.2- Le modèle MPTP

Le MPTP, toxique pour les neurones dopaminergiques, a été découvert accidentellement par de jeunes toxicomanes dans les années 1980. Après s'être injectés de l'héroïne de synthèse contaminée par du MPTP, ils ont développé une forme stable mais irréversible de la MP (Langston et al., 1999). Contrairement à la 6-OHDA, le MPTP passe la barrière hémato-encéphalique. Elle est convertie en MPP<sup>+</sup> par la monoamine oxydase B (MAO-B) dans les astrocytes et est captée par les neurones dopaminergiques via le

transporteur de la dopamine. Le MPP<sup>+</sup> est un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Son accumulation dans la cellule entraîne une diminution de la synthèse d'ATP et conduit à la mort cellulaire. Là encore, la neurodégénérescence est limitée essentiellement à la SN.

#### 4.1.3- Autres modèles toxiques : les pesticides

Les modèles animaux induits par des pesticides peuvent notamment aider à établir un lien causal de toxiques environnementaux dans l'étiologie de la MP. Les principaux utilisés sont la roténone ou le paraquat et le Maneb. Ce sont des inhibiteurs des complexes mitochondriaux (I pour la roténone et le paraquat, III pour le Maneb). Ces nouveaux modèles ont pour objectif de reproduire au maximum les troubles physiopathologiques et cliniques de la MP en induisant des dégénérescences d'autres systèmes de neurotransmetteurs ainsi que dans d'autres structures.

Les principaux intérêts des modèles neurotoxiques sont leur rapidité et leur simplicité permettant d'obtenir rapidement une lésion neuronale relativement spécifique des neurones dopaminergiques de la SN et ainsi de tester des molécules anti-parkinsoniennes ou le bénéfice de nouvelles thérapies telles que la transplantation ou la thérapie génique (Bjorklund et al., 2003). Toutefois, ces modèles ne vont pas reproduire toutes les caractéristiques de la maladie notamment la présence de LB dans les neurones dopaminergiques ni le caractère progressif de la maladie et surtout ne visent à reproduire principalement que l'atteinte de la substance noire ce qui ne représente donc qu'un pan de la pathologie bien plus complexe.

Aux vues des limites de ces modèles, il a été développé des modèles génétiques dans l'optique de reproduire le plus fidèlement possible la physiopathologie de la MP en s'appuyant sur les gènes associés aux formes familiales de MP.

### 4.2- Les modèles génétiques

#### 4.2.1- Les modèle de maladie de Parkinson autosomique dominante

Les deux principaux gènes responsables d'une MP autosomique dominante sont l' $\alpha$ -syn, LRRK2 et Nurr1.

##### a. Modèles $\alpha$ -syn



Concernant l' $\alpha$ -syn, plusieurs modèles animaux ont été créés à partir de formes mutées ou non du gène humain. Tout d'abord, les modèles de drosophile utilisant l' $\alpha$ -syn mutée ou sauvage montrent la formation d'inclusions protéiques semblables au corps de Lewy, amenant à la dégénérescence des neurones dopaminergiques associée à des troubles moteurs (Feany et Bender, 2000). De plus, la perte de ces neurones est dépendante de la phosphorylation de la sérine 129 de l' $\alpha$ -syn (Chen et al., 2005). Chez les souris transgéniques  $\alpha$ -syn mutée ou non, aucune perte neuronale n'a pu être établie alors que des troubles moteurs et la formation d'inclusions ont été observés (Masliah et al., 2000). Richfield et al., a, par la suite, développé une souris exprimant l' $\alpha$ -syn sauvage ou doublement mutée (A30P et A53T) sous le contrôle du promoteur de la TH. Ceci permet en effet de cibler l'expression du transgène dans les neurones catécholaminergiques et notamment les neurones dopaminergiques. Ce modèle présente une baisse du taux de dopamine dans le striatum et du transporteur de la dopamine à 4 mois, associée à une baisse de l'activité locomotrice et de la coordination entre 7 et 9 mois (Richfield et al., 2002). Trois autres études ont été réalisées chez la souris montrant que l'expression de l' $\alpha$ -syn sauvage ou mutée sous le contrôle du promoteur du prion de souris entraîne la formation d'inclusions cytoplasmiques et des troubles de la fonction motrice (Giasson et al., 2002 ; Lee et al., 2002 ; Gispert et al., 2003).

Puis, se sont développés des modèles génétiques de la MP par induction virale. Malgré la formation de corps de Lewy, l'expression de l' $\alpha$ -syn est forte, rapide, et non spécifique des neurones dopaminergiques. Une équipe a d'abord montré que l'expression d' $\alpha$ -syn humaine mutée ou non au niveau de la SN de rat via un lentivirus induit la perte sélective des neurones dopaminergiques de la SN associée à une dénervation dopaminergique du striatum et à la formation d'inclusions sans perte cellulaire, suggérant que les inclusions ne sont pas la cause de la neurodégénérescence (Lo Bianco et al., 2002). Une autre étude, chez le primate non-humain, a montré une perte de neurones dopaminergiques de la SN associée à des troubles moteurs ainsi que la formation d'inclusions cytoplasmiques après surexpression d' $\alpha$ -syn sauvage ou mutée via un adénovirus (Kirik et al., 2003). Une étude menée sur la souris s'est intéressée au système nerveux entérique. Ces souris, chez lesquelles l' $\alpha$ -syn est placée sous le contrôle du promoteur pan-neural Thy-1, sont atteintes d'une dysfonction de l'activité motrice du colon mais aussi d'une dysfonction olfactive avec la présence d'agrégats d' $\alpha$ -syn dans les neurones olfactifs ce qui évoque celles retrouvées chez le patient parkinsonien à un stade précoce de la maladie (Lebouvier et al., 2009).

#### **b. Modèles LRRK2**

Une surexpression du gène LRRK2 humain chez la drosophile conduit à une perte de neurones dopaminergiques et à une réduction âge-dépendante de la réponse à un traitement dopaminergique. Des modèles transgéniques murins exprimant le gène LRRK2 humain sauvage ou muté via un chromosome bactérien artificiel présentent une très faible neurodégénérescence. La plupart des souris transgéniques LRRK2 ne présentent pas de perturbation du système nigro-strié tel une perte importante de neurones dopaminergiques de la SN et des troubles moteurs. Cependant, l'un des modèles murins transgéniques exprimant le gène LRRK2 muté (R1441G) présente un déficit moteur progressif et âge-dépendant sans pour autant observer de neurodégénérescence dans la substance noire (Dawson et al., 2010).

### c. Modèles Nurr1

Nurr-1 est le dernier gène impliqué à avoir été identifié. Deux mutations ponctuelles ont été observées chez des familles européennes (Le et al., 2003). La protéine Nurr-1 est indispensable au développement et au maintien des neurones dopaminergiques. Les souris KO pour ce gène présentent, en effet, un défaut de développement des neurones dopaminergiques sans affecter les autres populations neuronales. La surexpression de Nurr-1 n'est au contraire pas suffisante pour provoquer la différenciation neuronale dopaminergique.

## **4.2.2- Les modèle de maladie de Parkinson autosomique récessive**

Les trois principaux gènes étudiés à l'origine d'une forme autosomique récessive de la MP sont la parkine, PINK1 et DJ-1.

### a. Modèles parkine

La parkine intervient dans l'une des voies majeures de dégradation des protéines cellulaires, la voie ubiquitine ligase. Des mutations de celle-ci ont été découvertes chez des patients atteints par une forme autosomale récessive et en général juvénile de la maladie (Kitada et al., 1998). Des drosophiles knock-out pour ce gène ont montré une durée de vie réduite, une stérilité pour les drosophiles mâles, et des capacités de vol et de grimper fortement altérées. Des drosophiles exprimant une parkine mutée montrent une dégénérescence musculaire avec des fibres musculaires réduites et un vol irrégulier, des mitochondries de petites tailles, ainsi qu'une dégénérescence de neurones dopaminergiques. En revanche, aucune des souris knock-out pour la parkine, ne montre des troubles du système dopaminergique ou du comportement. De manière intéressante, la surexpression de formes

mutées de la parkine humaine chez la drosophile et chez la souris entraîne une mort progressive des neurones dopaminergiques (Dawson et al., 2010).

### **b. Modèles PINK1**

PINK1 est lié à un phénotype précoce (1 à 2 % des cas se développant entre 20 et 40 ans) (Valente et al., 2004). Cette protéine jouerait un rôle de protection contre les dysfonctionnements de la mitochondrie. Des drosophiles knock-out montrent une incapacité au vol et une vitesse de grimpe réduite. On retrouve chez ces drosophiles, une dégénérescence mitochondriale entraînant l'apoptose des cellules musculaires. Les modèles murins déficients en PINK1 ne présentent aucune perturbation, avec par exemple, un nombre de neurones dopaminergiques, un taux de dopamine dans le striatum et un niveau d'expression des récepteurs dopaminergiques, inchangés. L'expression transgénique de la parkine chez une drosophile knock-out pour PINK1 améliore son phénotype, alors que l'inverse (expression transgénique de PINK1 chez une drosophile knock-out pour la parkine) n'entraîne pas d'amélioration substantielle. Ainsi, la parkine et PINK1, chez la drosophile, interviennent dans une voie commune, avec une implication de PINK1 en amont de la parkine (Dawson et al., 2010).

### **c. Modèles DJ-1**

La protéine DJ-1 intervient dans les interactions protéine-protéine. Des mutations de ce gène ont été retrouvées chez des familles de patients italiens et hollandais (Bonifati et al., 2003). Les premiers modèles animaux ont également été réalisés chez la drosophile. Mais contrairement aux mammifères, la drosophile possède deux gènes DJ-1 orthologues : DJ-1a et DJ-1b. De nombreux modèles chez la drosophile ont ainsi été conçus afin d'évaluer la contribution de DJ-1 dans la pathogénèse de la maladie de Parkinson. Des drosophiles knock-down pour les gènes DJ-1 par l'utilisation d'ARN interférents montrent une perte âge-dépendante de neurones dopaminergiques. Comme pour la parkine et PINK1, des souris knock-out pour DJ-1 ne présentent pas de perturbations majeures. Des perturbations dans la neurotransmission dopaminergique au sein du circuit nigro-strié et des dysfonctions mitochondriales ont été observées chez quelques animaux knock-out pour DJ-1 (Dawson et al., 2010).

Etant donné que les modèles murins knock-out pour la parkine, PINK1 et DJ-1 ne présentent pas de pathologies nigro-striées, ils pourraient au mieux représenter les tous premiers changements d'une maladie de Parkinson débutante. Hors l'utilité de tels modèles

est de comprendre comment les mutations de ces gènes conduisent à un dysfonctionnement précoce du système dopaminergique nigro-strié donc ces modèles ne peuvent actuellement pas être utilisés pour tester des stratégies thérapeutiques, par exemple, neuroprotectrices. Ces modèles demandent actuellement à être optimisés (Dawson et al., 2010)

## II- Objectifs

L'objectif de ce travail a été de créer un nouveau modèle d'étude de la MP. En effet, les mécanismes mis en jeu dans la MP restent méconnus et les modèles actuels les plus couramment utilisés sont des modèles neurotoxiques avec toutes les limites que l'on a précédemment décrites. L'intérêt était donc de créer un modèle génétique mimant le développement et les aspects cliniques de la pathologie humaine afin de pouvoir étudier et mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu. Le gène de l' $\alpha$ -syn s'est naturellement imposé dans le choix du transgène, celui-ci semblant être une clé dans la MP. Après avoir créé plusieurs lignées de rat transgéniques pour l' $\alpha$ -syn présentant deux des mutations retrouvées dans les formes familiales de la MP, l'objectif a été de pérenniser l'élevage et de caractériser le modèle à différents niveaux : moléculaire, protéique et comportemental.

La finalité étant de pouvoir utiliser ce modèle afin d'étudier la pathologie et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## III- Résultats

### 1- Création et développement des lignées

A partir des 3 mâles transgéniques (MA2, MA3 et MA4) produits par Genoway (Hambourg, Allemagne) et en collaboration avec la plate-forme de transgénèse dirigée par Ignacio Anegón (INSERM U643, Nantes, France), des accouplements avec des femelles SPD sauvages ont été réalisés (Tableau 4). Ces croisements ont permis d'obtenir 10 rats de seconde génération. Ces rats F1 proviennent essentiellement d'un rat fondateur nommé MA3. MA2 n'a pas donné de rats transgéniques alors que MA4 a donné plus tardivement une descendance. Cette dernière lignée est en cours d'étude par une autre étudiante en thèse. Tous les résultats qui seront présentés dans cette partie proviennent donc d'études effectuées à partir de rats de la lignée MA3.

Quatre rats de la génération F1 ont été conservés pour l'élevage, 2 femelles et 2 mâles. Les autres ont été sacrifiés dans le but de caractériser notre modèle. Une troisième génération est née des accouplements entre les rats de la génération F1. On compte 28 rats de la génération F2. De la même façon, 2 femelles et 2 mâles ont été gardés pour l'élevage et les autres rats ont été sacrifiés pour diverses expériences de biologie moléculaire et d'immunohistochimie. Par ailleurs, une portée de 10 rats (5 transgéniques et 5 témoins) a été conservée pour l'étude comportementale. Aujourd'hui, nous avons obtenu 6 générations de rats issus de MA3 ce qui correspond à 78 rats transgéniques.

Pour déterminer si le transgène est présent ou non dans le génome des rats provenant d'accouplement dans la lignée MA3, une biopsie de la queue est réalisée chez tous les ratons à environ 2 semaines. L'ADN de ces biopsies est extrait et analysé par PCR. Les échantillons migrent sur un gel d'agarose.

Les échantillons 1, 2 et 3 correspondent aux 3 rats de la portée obtenue à la suite du croisement entre la femelle F1 transgénique MA3 4.4 et un mâle sauvage SPD 980. De l'eau est utilisée comme témoin négatif et l'échantillon 4703 est un témoin positif pour l' $\alpha$ -syn humaine. Il permet aussi de marquer la taille de l' $\alpha$ -syn. L'HPRT est notre gène de référence qui permet de déterminer si l'extraction d'ADN et la PCR ont été réussies.

Par ailleurs, la plateforme de transgénèse de l'IFR 26 (dirigée par I. Anegon, INSERM UMR 643) poursuit les micro-injections de transgène dans des embryons. Le plasmide contenant la construction a été injecté dans environ 600 zygotes, 126 embryons ont été implantés dans l'utérus de femelles gestantes, 16 ratons sont nés, 1 seul est transgénique.

Après la naissance des ratons, de la même façon que pour les animaux nés de nos différents croisements, nous déterminons la présence ou non du transgène à partir de l'ADN des biopsies de queues. Ainsi, nous avons obtenu un nouveau rat transgénique fondateur, une femelle (FE10.1). Ce rat a donné naissance à un unique rat transgénique  $\alpha$ -syn<sup>+</sup> de première génération. Malheureusement, ce rat n'a pas donné de descendance. La lignée s'est donc éteinte avant toute caractérisation.

De plus, le nombre de copies de transgène par cellule a été quantifié pour chaque portée. Les croisements entre individus possédant une à 2 copies étant privilégiés.

## 2- Analyse de l'expression de transcrits par PCR quantitative en temps réel

Pour compléter la caractérisation de notre modèle, nous avons réalisé une étude de l'expression du transgène par PCR quantitative dans les différentes structures du cerveau. Cette expérience va nous permettre d'affiner l'expression du transgène et de différents gènes liés à la dopamine (synthèse, transport) et de facteurs neurotrophiques GDNF et BDNF. Ainsi, 3 rats transgéniques et 3 rats témoins ont été sacrifiés et leur cerveau a été disséqué. Six structures cérébrales sont analysées : la substance noire (SN), les bulbes olfactifs (BO), le striatum (Stri), le cortex (CO), le cervelet (Cb) et le tronc cérébral (Pons). L'ARNm des gènes de l' $\alpha$ -syn humaine, de la TH, du BDNF, des récepteurs D1 et D2 et de la DAT sont quantifiés.

Comme dans l'étude immuno-histochimique, nous observons une forte expression du transgène au niveau des BO. L'ARNm codant pour l' $\alpha$ -syn humaine est aussi retrouvée dans la SN et dans une moindre quantité dans le striatum et le cortex des rats transgéniques.

En ce qui concerne l'ARNm de la TH de rat, nous le retrouvons en forte quantité dans la SN des rats témoins. Nous observons une forte diminution de la quantité d'ARNm de la TH dans la SN des rats transgéniques. Dans les BO, aucune différence n'est notée entre les rats transgéniques et les rats témoins. Les rats transgéniques présentent une forte expression de l'ARNm de la TH dans le cortex.

Dans la SN, l'expression de l' $\alpha$ -syn humaine doublement mutée est corrélée avec une diminution significative de l'expression de l'ARNm codant pour la TH de rat.

L'analyse de l'expression du récepteur D1 a montré une augmentation significative de la quantité d'ARNm de ce gène dans les BO et le cortex des rats transgéniques. Nous observons aussi une diminution de l'ARNm du récepteur D1 dans le striatum des rats transgéniques par comparaison avec les rats témoins. Dans les autres structures, SN, cervelet et pons, aucune différence n'est à noter dans l'expression de l'ARNm de ce récepteur.

L'expression de l'ARNm du récepteur D2 présente une augmentation significative dans les BO, le striatum et le cortex des rats transgéniques. En revanche, l'expression du récepteur D2 n'est pas modifiée dans la SN, le cervelet ou le tronc cérébral.

Les rats transgéniques présentent une diminution significative du taux d'ARNm du transporteur à la dopamine (DAT) dans la SN et le striatum par rapport aux rats témoins. Par ailleurs, nous notons une augmentation significative de cet ARNm dans le cortex des rats transgéniques. Aucune différence n'est observée pour l'expression du DAT dans les BO, le cervelet et le tronc cérébral.

L'analyse de l'expression du facteur neurotrophique GDNF montre que les rats transgéniques présentent un taux d'ARNm codant ce gène significativement plus important dans les BO et le cortex en comparaison avec les rats témoins. Dans les autres structures analysées (SN, striatum, cervelet et le tronc cérébral), nous n'observons pas de différence significative entre les 2 groupes de rats.

Nous observons enfin une augmentation du taux d'ARNm du BDNF dans les BO, le striatum et le cortex des rats transgéniques comparé aux rats témoins. L'expression du BDNF n'est pas modifiée dans la SN le cervelet et le tronc cérébral.

### 3- Test des anticorps anti- $\alpha$ -synucléine

Afin de caractériser notre modèle transgénique de la MP, des rats âgés de 3 à 25 mois ont été perfusés. Leur cerveau a été coupé au cryostat. Les coupes de 16  $\mu$ m ont été récupérées de façon sériées sur des lames cotées à la gélatine. Ainsi, différents marquages et colorations ont pu être réalisés sur l'ensemble des structures du cerveau notamment les BO et la SN.

L'analyse commence par une coloration au Crésyl violet afin d'étudier l'architectonique du cerveau. Ce marquage n'a pas montré de différences significatives entre les rats témoins et les rats transgéniques et ce quel que soit leur âge.

Un marquage de l' $\alpha$ -syn humaine est réalisé afin de cartographier l'expression du transgène dans les différentes structures du cerveau. Pour cela, l'affinité de différents anticorps a été évaluée dans un premier temps sur une lignée cellulaire transfectée avec un vecteur viral codant pour l' $\alpha$ -syn humaine puis sur des coupes de cerveau au niveau de la SN.

Nous avons ainsi choisi l'anticorps anti- $\alpha$ -syn humaine MAB0261 de Biosource (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cet anticorps ne présente aucune cross-réaction avec le rat. Nous pouvons donc observer l'expression du transgène indépendamment de l' $\alpha$ -syn endogène.

## 4- Etude des bulbes olfactifs

### 4.1- Analyse immunohistochimique

Nous avons comparé l'expression de l' $\alpha$ -syn humaine à celle de la TH de rat. La première structure observée a été le BO. Dans cette structure, une région nous intéresse plus particulièrement. Ce sont les glomérules olfactifs. En effet, des neurones dopaminergiques sont présents dans cette zone du BO.

Une forte expression de l' $\alpha$ -syn humaine a été observée dans les bulbes olfactifs des rats transgéniques âgés de 3 à 25 mois contrairement aux rats témoins. L' $\alpha$ -syn humaine est exprimée dans une zone du BO exprimant la TH, les glomérules.

Une analyse au microscope confocal permet de mettre en évidence une colocalisation de l' $\alpha$ -syn humaine (en rouge) et de la TH de rat (en vert) au niveau des glomérules dans les BO.

### 4.2- Détection d'agrégats protéiques

Suite à un marquage de l' $\alpha$ -syn humaine, nous avons observé des agrégats d' $\alpha$ -syn humaine dans les neurones dopaminergiques de la zone glomérulaire des BO des rats transgéniques âgés de 25 mois. Un marquage à la Thioflavine T a permis de mettre en évidence la présence d'agrégats protéiques dans les BO de rat âgé de 21 mois. Au niveau des BO, ces agrégats sont uniquement retrouvés dans les cellules de la zone glomérulaire des rats transgéniques, ce qui suggère l'implication de l' $\alpha$ -syn humaine dans l'apparition de ces agrégats. Cependant, nous n'avons pas de contrôle positif pour cette expérience. En effet, une coupe de cerveau humain provenant d'un patient décédé d'une démence à corps de Lewy pourrait nous permettre d'avoir un contrôle fort de cette expérience.

### 4.3- Mesure de la largeur de la zone glomérulaire

Des photos des BO (dont la TH a été immuno-marquée) de 5 rats transgéniques et 5 rats témoins âgés de 25 mois ont été prises. La largeur de la zone glomérulaire a été mesurée dans le but d'évaluer une éventuelle différence de l'innervation dopaminergique dans les BO entre les rats transgéniques et les rats témoins. Les BO sont divisés en 3 parties égales. Nous observons une augmentation significative de la largeur de la zone glomérulaire dans la partie médiane du BO chez les rats transgéniques à 25 mois.



#### 4.4- Comptage des cellules TH-positives dans la zone glomérulaire du BO

Les cellules TH-positives et les cellules exprimant l' $\alpha$ -syn humaine des BO de rats âgés de 25 mois ont été quantifiées sur 6 coupes consécutives. Nous avons pu observer que les rats transgéniques présentent un plus grand nombre de neurones dopaminergiques que les rats témoins dans la zone glomérulaire. En effet, les rats transgéniques comptent 27 % de neurones dopaminergiques en moins par rapport aux rats témoins à 25 mois. Par ailleurs, nous avons noté qu'il existe une importante variabilité entre les individus en ce qui concerne l'expression protéique du transgène dans la zone glomérulaire et dans la couche de cellules mitrales. La différence observée dans le nombre de neurones dopaminergiques dans la zone glomérulaire entre les rats transgéniques et les rats témoins n'est pas retrouvée dans la couche de cellules mitrales.

#### 4.5- Analyse de la fonction olfactive des rats

L'un des premiers symptômes de la MP est un trouble de l'olfaction. De plus, notre modèle présente une forte expression de l' $\alpha$ -syn dans les BO dès 3 mois. Ces 2 observations nous ont conduits à analyser la fonction olfactive des rats transgéniques.

##### a. Chez le raton

Dans un premier temps, nous avons testé la fonction olfactive des ratons à l'âge de 7 jours. A cet âge, les ratons sont aveugles et vont se déplacer uniquement grâce à leur fonction olfactive.

Une centaine de ratons ont été testés. Aucune différence significative n'a été observée entre les rats transgéniques et les rats témoins. Au cours du test qui dure 2 minutes, les ratons transgéniques et témoins passent 60 % du temps de l'expérience au-dessus du compartiment comprenant la sciure de sa propre cage. Cette sciure contient l'odeur de la mère et de la portée. Les ratons testés en se déplaçant sur ce compartiment montrent qu'ils perçoivent les odeurs. Ce test est réalisé en aveugle. En effet, le génotypage des ratons est réalisé à l'âge de 2 semaines.

Les rats transgéniques ne présentent donc pas de troubles de la fonction olfactive à la naissance. Notre étude a pour objectif de développer un modèle progressif de la MP. Aucun trouble n'est détecté à la naissance, il nous faut donc tester les rats au cours du temps.

#### **b. Chez l'adulte, perception d'une odeur répulsive**

Nous avons développé des tests afin d'analyser la fonction olfactive des rats adultes. Tout d'abord, nous avons testé la fonction olfactive des rats en évaluant la perception par les animaux d'une odeur répulsive, celle de l'acide acétique. Les tests ont été réalisés avec 4 rats témoins (en noir) et 7 rats transgéniques (en gris) âgés de 1 à 2 ans. L'analyse des films sur les rats témoins ont montré des résultats positifs c'est à dire que l'odeur perçue lorsque le papier filtre imbibé d'acide acétique à 40 % est présenté, est répulsive. Le rat fait alors un mouvement de retrait ; il perçoit donc cette odeur. Nous présentons le papier filtre 4 fois à chaque rat. Ainsi un score sur 4 est attribué à chaque rat, 4 traduisant un retrait à chaque présentation de l'odeur. Le test est aussi réussi par les rats transgéniques MA2 et MA4, deux fondateurs. Par contre, il semble y avoir une différence pour les rats de la lignée MA3. Ces animaux obtiennent un score pour ce test environ deux fois moins bon que les autres rats c'est-à-dire qu'ils vont réaliser un retrait, lorsque le papier filtre imbibé d'acide acétique leur est présenté, qu'une fois sur 2.

Ce test nous a permis de mettre en évidence l'apparition de troubles de la fonction olfactive chez 5 rats âgés de 1 à 2 ans de la lignée MA3. Cependant, après quelques sessions de test, un problème est survenu. Les rats témoins utilisés pour cette expérience ont commencé à faire des apnées lorsque le papier filtre imbibé d'acide acétique leur était présenté. Leur score a donc chuté. Le témoin positif de l'expérience n'étant plus fiable, nous avons dû développer un nouveau test.

#### **c. Chez l'adulte, perception d'une odeur attractive**

Pour ce nouveau test, nous avons utilisé une odeur attractive, le lait de coco. Ce test a été réalisé avec 4 rats témoins et 4 rats transgéniques. De plus, l'olfaction des 10 rats (5 transgéniques et 5 témoins) utilisés dans l'étude comportementale a été analysée dans ce test entre 9 et 25 mois.

Les rats témoins sont attirés par l'odeur du lait de coco et vont passer une majorité du temps de l'expérience dans le compartiment contenant le papier filtre imbibé de lait de coco.

Le ratio odeur / eau va donc augmenter. Au fur et à mesure des sessions de tests, les rats témoins passent de plus en plus de temps du côté du lait de coco. A 25 mois, les rats témoins passent les  $\frac{1}{2}$  du temps de l'expérience du côté de l'odeur. Les rats transgéniques quant à eux vont explorer de façon égale tous les compartiments de l'expérience quelque soit l'âge auquel ils sont testés. Ceci est traduit par leur rapport odeur/eau qui reste relativement stable autour de 1.

#### **4.6- Analyse de l'expression du transgène par Western blot**

Une étude de l'expression de l' $\alpha$ -syn humaine a été réalisée par Western blot dans les BO de 2 rats transgéniques et 1 rat témoin. Les rats ont été sacrifiés et leur cerveau disséqué. Nous avons mis en commun les BO des 2 rats transgéniques afin d'obtenir un échantillon plus important.

Seuls les rats transgéniques présentent une bande correspondant à l' $\alpha$ -syn humaine dans les BO. De plus, il semble que les rats transgéniques ont une plus grande quantité d' $\alpha$ -syn de rat au niveau des BO que les rats témoins. Cependant, ces résultats restent à confirmer en augmentant le nombre d'expériences.

### **5- Etude de la voie nigro-striée**

#### **5.1- Analyse immunohistochimique**

Pour continuer la caractérisation du profil d'expression du transgène dans le cerveau, nous avons réalisé des marquages de l' $\alpha$ -syn humaine et de la TH de rat au niveau de la SN. Un important réseau de neurones dopaminergiques est observé chez le rat témoin. Les rats transgéniques présentent un marquage d'intensité moins importante bien que toutes les coupes aient été marquées en même temps, dans les mêmes conditions. Le marquage de l' $\alpha$ -syn humaine permet de détecter quelques neurones exprimant le transgène chez les rats transgéniques.

Nous avons réalisé un comptage des cellules exprimant le transgène dans la SN de rats transgéniques âgés de 25 mois. Les résultats montrent une variabilité inter-individu. En effet, le nombre de neurones exprimant l' $\alpha$ -syn humaine varie de 437 à 1067 entre les différents rats.

## 5.2- Analyse de la neurodégénérescence

Nous avons voulu savoir si notre modèle présente une neurodégénérescence au niveau de la SN. Nous avons donc réalisé un comptage des neurones exprimant la TH de rat dans la SN et la VTA de 5 rats témoins et 5 rats transgéniques.

Nous avons observé une perte de 6 % des neurones dopaminergiques dans la SN et la VTA des rats transgéniques à 25 mois. Cependant cette perte n'est pas significative.

Toutefois, la tendance observée dans la quantification des neurones dopaminergiques ainsi que la moindre intensité du marquage des neurones TH-positifs dans la SN des rats transgéniques nous ont conduits à analyser la densité optique du striatum après un marquage TH. Une baisse de densité optique traduirait une dégénérescence des fibres dopaminergiques. Cependant aucune différence significative n'a été observée entre les rats transgéniques et les rats témoins âgés de 25 mois.

## 5.3- Etude du comportement neurologique et moteur

Tout au long de l'étude, les rats sont pesés afin de suivre leur état général. La pesée est réalisée tous les mois au début de la session de tests comportementaux. Nous pouvons constater que le poids moyen des 2 groupes de rats évolue de la même façon. Il n'y a aucune différence entre le groupe de rats témoins et celui des rats transgéniques au cours du temps. L'expression du transgène n'a aucune influence sur l'état général des rats.

Les rats subissent une batterie de tests neurologiques et moteurs. Nous avons réalisé l'analyse comportementale avec 5 rats transgéniques, 5 rats témoins de la même portée que les rats transgéniques et 8 rats SPD sauvages. Il n'y a pas de différence entre les rats témoins et les rats sauvages. Cependant, les rats témoins montrent une plus grande variabilité inter-individu que les rats sauvages. Cette variabilité va avoir tendance à diminuer l'effet observé. C'est pourquoi nous avons choisi de présenter les résultats des tests neurologiques des rats transgéniques comparés aux rats sauvages puis dans un second graphique les rats transgéniques comparés aux rats témoins.

Nous commençons la session par les tests neurologiques. Le visual test permet d'évaluer le réflexe visuel du rat. En effet, lorsqu'il est maintenu par la queue au dessus de la table, un rat normal va avoir le réflexe de présenter ces pattes antérieures pour appréhender la surface de la table. Les résultats de ce test montrent qu'à 18 mois et à partir de 22 mois, les rats transgéniques vont obtenir un score significativement moins bon que les rats témoins.

En ce qui concerne le test de placement postérieur, nous observons une différence significative entre le groupe de rats transgéniques et celui des rats témoins à partir de 17 mois. En effet, les rats transgéniques vont mettre plus de temps à rétablir la position de leurs pattes postérieures ou la rétablir qu'en partie.

Enfin, le dernier test neurologique (test de placement postérieur induit par la perte de support) montre des résultats similaires au test de placement postérieur. La différence entre les 2 groupes est observée dès 16 mois et semble plus importante que dans le test de placement postérieur. De la même façon que pour le test précédent, les rats transgéniques mettent plus de temps à reprendre la position normale de leur patte ou ne la reprennent pas entièrement.

Quand nous comparons les rats transgéniques avec les rats témoins, nous n'observons pas de différence entre les 2 groupes pour le test de placement visuel. Le test du placement postérieur montre une différence à 22 et 23 mois entre les rats transgéniques et les rats témoins de la même portée. Alors que pour le test de placement postérieur induit par la perte de support, nous observons une différence entre les rats transgéniques et les rats témoins à partir de 16 mois.

Les rats témoins présentent la même variabilité que les rats transgéniques dans les différents tests. Par contre, nous avons observé que les rats sauvages ont des résultats plus homogènes.

Nous avons aussi réalisé des tests moteurs. La coordination motrice des rats est testée dans le test de l'entrée dans la cage alors que le stepping test va tester la capacité d'initiation des mouvements des rats.

Le test d'entrée dans la cage montre une différence entre les rats transgéniques et les rats témoins à partir de 19 mois. En effet, les rats transgéniques vont mettre plus de temps à rentrer dans leur propre cage que les rats témoins. Les rats transgéniques présentent donc un trouble de la motricité fine à partir de 19 mois.

Pour le stepping test, nous notons une différence entre les rats transgéniques et les rats témoins pour les points 17, 18, 22 et 23 mois. Pour ces 4 sessions, les rats transgéniques vont montrer une différence entre leurs 2 pattes contrairement aux rats témoins qui font le même nombre de rétablissements avec leurs 2 pattes antérieures. Nous avons aussi remarqué que les rats transgéniques font plus de rétablissements posturaux avec l'une de leurs pattes antérieures que les rats témoins. Ce résultat est surprenant car des animaux lésés à la 6-OHDA ont plutôt une tendance à faire moins de rétablissements (Paillé et al., 2004, 2007). Dans cette étude réalisée au sein du laboratoire, le même protocole a été utilisé.

Nous avons choisi de présenter les résultats du stepping test par un rapport du score de la patte antérieure droite sur ceux de la patte antérieure gauche. En effet, nos rats transgéniques montrent en général une légère différence entre leurs 2 pattes. Le fait d'additionner les 2 pattes aurait atténué cette observation.

Dans le test du rotarod, nous n'observons pas de différence entre les rats transgéniques et les rats témoins globalement sauf pour les mois 17 et 25. Pour ces 2 sessions, nous pensons qu'il s'agit plus d'un déficit de motivation que d'une altération de la fonction motrice.

## **6- Etude des autres structures**

L'analyse par immunohistochimie de l'ensemble du cerveau a révélé que d'autres structures telles que le LC contiennent des cellules exprimant l' $\alpha$ -syn humaine.

### **6.1- Le locus coeruleus**

Le LC est une structure composée de noyaux riches en neurones noradrénergiques. Ces neurones expriment donc la TH. De plus, cette structure est aussi atteinte chez les patients. Nous avons observé l'expression du transgène dans les neurones de cette structure. Le marquage de la TH chez les animaux transgéniques semble plus faible que chez les rats témoins. D'après le comptage des neurones TH-positifs de cette structure, les rats transgéniques présentent une perte de 23 % des neurones noradrénergiques. Cependant la

différence n'est pas significative. Ce résultat ne représente qu'une tendance. Nous devons augmenter la taille des groupes afin de pouvoir confirmer ou non cette tendance.

## **6.2- La zone périventriculaire**

Nous avons aussi retrouvé des cellules exprimant l' $\alpha$ -syn humaine autour du troisième ventricule. Les marquages ont montré quelques gros neurones exprimant la TH de rat et l' $\alpha$ -syn humaine. Les comptages des neurones TH-positifs n'ont révélé aucune différence entre le groupe des rats témoins et celui des rats transgéniques.

## **6.3- Le cortex cérébral**

De la même façon, nous avons retrouvé des neurones présentant une accumulation d' $\alpha$ -syn humaine mutée dans le subiculum et dans le cortex cérébral occipito-pariétal des rats transgéniques. Or des corps de Lewy ont été retrouvés dans des neurones corticaux de patients décédés de la MP (Braak **et al.**, 2006).

# **V- Discussion**

Le but de cette étude était de développer un nouveau modèle de la MP plus proche de la pathologie humaine que ceux existants. Notre modèle est un rat transgénique qui exprime donc le gène humain de l' $\alpha$ -syn doublement muté sous le contrôle du promoteur de la TH de rat. Ainsi, tout comme dans certaines formes héréditaires de la pathologie humaine, nous espérons observer l'expression du transgène dans les neurones dopaminergiques des rats. En orientant l'expression de l' $\alpha$ -syn humaine doublement mutée dans les neurones dopaminergiques, nous voulons provoquer la dégénérescence de cette population neuronale et ainsi observer l'apparition de la symptomatologie caractéristique de la MP en étant le plus proche de la physiopathologie de la maladie.

## La création du modèle.

Différents modèles animaux de la MP existent déjà. Les modèles toxiques sont les plus utilisés. Ils ont l'avantage de léser les neurones dopaminergiques de façon spécifique et massive et de reproduire les symptômes moteurs. Mais ces modèles ne sont pas progressifs et nécessitent le développement de nouveaux modèles tels que les animaux transgéniques (Blandini et al., 2012). Un certain nombre d'animaux transgéniques ont été créés notamment à partir du gène de l' $\alpha$ -syn et autres synucléines (Greten-Harrison et al., 2010 ; Dawson et al., 2010). Nous savons que ce gène est responsable, par sa mutation ou sa répétition, d'une forme génétique dominante de la MP. De plus, l' $\alpha$ -syn est le composant majeur des corps de Lewy, marqueur histologique de la pathologie. La protéine joue donc un rôle dans le processus physiopathologique dans la majorité des formes de MP. C'est pourquoi il semble intéressant de développer des modèles à partir de ce gène. Les souris transgéniques exprimant l' $\alpha$ -syn mutée ou non (surexpression) montrent la présence de clusters d' $\alpha$ -syn dans les neurones de la SN, des troubles moteurs mais aucune perte neuronale significative (Masliah et al., 2000 ; Giasson et al., 2002). Par contre, une équipe a montré que l'expression d' $\alpha$ -syn mutée (A53T) par un lentivirus chez le rat provoque une neurodégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc associée à des troubles moteurs (Kirik et al., 2002 ; LoBianco et al., 2002). Ces observations ont convaincu notre équipe de développer un nouveau modèle d'étude de la MP. L'utilisation de modèle transgénique permet d'étudier les mécanismes de la maladie et notamment son caractère progressif. Par ailleurs, le rat est une espèce pour laquelle l'analyse comportementale est plus facile à réaliser et plus reproductible que chez la souris. De plus, sa taille permet un protocole expérimental simple et complet ce qui n'aurait pas été le cas pour développer un modèle simien.

Nous avons pu développer 2 lignées de rats transgéniques (MA3 et MA4) à partir des 4 fondateurs obtenus, 2 n'ayant pas donné de descendance. Les résultats présentés proviennent de l'étude de la lignée MA3, la lignée MA4 étant analysée par une collègue en thèse (Lelan et al., 2011). Même pour les lignées développées, nous avons eu quelques difficultés de développement des colonies soit dues à du cannibalisme soit à l'abandon des portées par les femelles. Nous avons pu rapprocher ces problèmes à la période de travaux à l'animalerie. Le manque de tranquillité et le stress induit pouvant expliquer ces comportements.

La MP est une pathologie neurodégénérative progressive. Le but de ce modèle est de développer un modèle le plus proche possible de la pathologie humaine, nous voulions donc



développer un rat présentant les symptômes progressivement. Or, les premiers symptômes moteurs apparaissent chez l'homme en général entre 50 et 60 ans c'est-à-dire environ aux 2/3 de la vie. Par extrapolation, Nous avons donc choisi d'étudier le comportement de nos animaux pendant 25 mois ce qui correspond aux 2/3 de la vie d'un rat afin que les résultats obtenus et donc le modèle soient les meilleurs outils possibles à la compréhension de la MP. Enfin, l'objectif étant de mimer la maladie et sa progressivité en étant un aspect majeur, nous avons privilégié les accouplements entre individus possédant un faible nombre de copie du gène  $\alpha$ -syn doublement muté ceci grâce à la détermination du nombre de copie par cellule.

### **BO et mise en évidence de l'hyposmie.**

Les symptômes caractéristiques de la MP sont les troubles moteurs. Cependant, comme décrit précédemment, ces symptômes moteurs sont le plus souvent précédés de symptômes non moteurs tels qu'un dysfonctionnement de la fonction olfactive (Hyposmie). Chez les patients, un dysfonctionnement de la fonction olfactive est observé dans environ 90 % des cas (Doty et al., 2007). Or, La MP est détectée lorsque les patients présentent les premiers symptômes moteurs et à ce stade 70 à 80 % des neurones dopaminergiques de la SNpc ont dégénéré (Schapira et al., 1999). Il serait donc intéressant de pouvoir diagnostiquer la maladie dans des stades plus précoces. Pour cela, il faut trouver un marqueur précoce de la MP. L'étude de l'olfaction et de son dysfonctionnement dans des modèles de la MP pourrait donc permettre de dépister plus précocement les patients et de mieux comprendre les premiers stades de la maladie. C'est pourquoi nous avons analysé les BO et la fonction olfactive des rats transgéniques. Notre rat présente une forte expression de l' $\alpha$ -syn humaine doublement mutée dans les neurones dopaminergiques de la zone glomérulaire ainsi qu'au niveau de la couche de cellules mitrales. Cette forte expression est observée dès 3 mois et est corrélée avec un dysfonctionnement de la fonction olfactive qui apparaît dès 6 mois. En effet, les rats transgéniques ne présentent pas de troubles de l'olfaction à la naissance alors que nous avons observé une différence entre les rats transgéniques et les rats témoins à l'âge adulte dans 2 tests olfactifs différents. Nous pouvons donc dire que l'expression de l' $\alpha$ -syn humaine doublement mutée dans les neurones dopaminergiques des BO induit une altération de la fonction olfactive corrélée au vieillissement des individus. Cette altération fonctionnelle peut traduire soit un défaut de détection, soit de discrimination des odeurs. Afin de dissocier ces 2 causes, nous avons utilisé 2 odeurs différentes, une odeur répulsive (l'acide acétique) et une

odeur attractive (le lait de coco). Or, quelle que soit l'odeur, les rats transgéniques ont présenté un déficit de l'olfaction ce qui supposerait que notre modèle présente plutôt une hyposmie qu'un déficit de discrimination des odeurs. D'autre part, nous avons retrouvé des agrégats protéiques dans les neurones de la zone glomérulaire par un marquage à la Thioflavine T et le marquage de l' $\alpha$ -syn humaine a aussi montré la présence d'agrégats d' $\alpha$ -syn dans la zone glomérulaire. Par contre, aucune agrégation ni même présence d' $\alpha$ -syn humaine ne sont retrouvées dans le cortex olfactif des rats transgéniques. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'expression et l'accumulation de l' $\alpha$ -syn humaine doublement mutée dans les neurones dopaminergiques de la zone glomérulaire est responsable du dysfonctionnement de la fonction olfactive de nos rats transgéniques.

Or, chez des patients dont la MP a été diagnostiquée depuis 12 ans en moyenne, le nombre de cellules dopaminergiques est augmenté de 100% dans les BO par rapport à un groupe de témoins d'âge et de genre comparables (Huisman et al., 2004). Il était donc intéressant de déterminer si cette expression d' $\alpha$ -syn exogène avait modifié l'innervation dopaminergique au niveau des BO. Une estimation a donc été réalisée en mesurant l'étendue de l'innervation dopaminergique de la zone glomérulaire sur 3 niveaux antéro-postérieurs du BO sur des coupes traitées avec un anticorps anti-TH qui a mise en évidence une différence significative entre les rats transgéniques et les rats témoins pour la mesure faite au niveau médian du BO (dans un axe antéro-postérieur). En effet, les rats transgéniques ont une innervation dopaminergique plus large, plus étendue au niveau de la partie médiane du BO. Cette augmentation de l'innervation dopaminergique n'est pas due à une augmentation de la taille des glomérules mais à une augmentation de la densité de neurones TH-positifs dans la zone glomérulaire des BO et non dans la zone granulaire (Lelan et al., 2011). Or, après analyse du transcriptôme par PCRq, nous observons une forte augmentation du taux d'ARNm codant pour les facteurs neurotrophiques BDNF et GDNF. Ces facteurs stimulent la neurogénèse et favorisent la survie neuronale dopaminergique (Bowenkamp et al. 1995). Il serait donc intéressant d'étudier la neurogénèse dans les BO. En effet, les troubles de l'olfaction observés chez nos rats transgéniques pourraient être dus à une augmentation de la neurogénèse. Ceci par la libération du BDNF et du GDNF qui augmenteraient la neurogénèse ou augmenteraient le flux de neuroblastes issus de la zone sous ventriculaire (SVZ). Les neurones exprimant cette  $\alpha$ -syn mutée pourraient très bien libérer ces facteurs directement ou par une voie indirecte en créant un environnement incitant les astrocytes à en libérer. Le flux de neuroblastes migrant de la SVZ est un mécanisme naturel traduit d'un point de vue

fonctionnel par la nécessité d'une neurogénèse continue dans les BO afin de permettre la discrimination de nouvelles odeurs (Alonso et al., 2006, Mandairon et al., 2006). Ainsi, chez le rongeur adulte, la SVZ produit des neuroblastes qui migrent vers les BO où 80 % d'entre eux se différencient en neurones dans les zones glomérulaire et granulaire, le reste donnant des cellules gliales (Winner et al., 2006). Cette hypothèse pourrait donc expliquer l'augmentation du nombre de neurones dopaminergiques et in fine l'inhibition de la transmission olfactive comme cela a été observé chez le patient. Or, le nombre de cellules prolifératives (marquage au Bromodeoxyuridine (BrdU)) migrant de la SVZ vers les BO chez notre rat transgénique est aussi augmenté dans la zone glomérulaire et non dans la zone granulaire (Lelan et al., 2011) ce qui supporte l'hypothèse de la perturbation de la neurogénèse.

Une dernière hypothèse serait que l'augmentation de la largeur glomérulaire et l'hyposmie induite pourraient aussi être les conséquences de l'augmentation de la pousse neuritique et axonale chez les neurones exprimant l' $\alpha$ -syn formant des connexions aberrantes comme cela a été décrit précédemment dans un modèle de souris transgénique Tau (Royal et al., 1999). Tau est certes une protéine impliquée dans une autre pathologie (Tauopathies) mais qui fait partie de la même famille de protéine mal repliée. On retrouve d'ailleurs ces 2 protéines associées dans les corps de Lewy.

D'un point de vue moléculaire, l'analyse du taux d'ARNm de la TH et du DAT ne montre aucune différence significative d'expression des ARNm dans les BO entre les rats témoins et les rats transgéniques à 25 mois. Cependant, ces analyses ont été réalisées sur les BO totaux alors qu'une augmentation de l'innervation dopaminergique a été mise en évidence dans les glomérules. Nous pouvons donc en déduire qu'il y a une diminution des niveaux de TH et de DAT par neurone dans les BO ce qui traduirait un dysfonctionnement des neurones dopaminergiques. Par ailleurs, les taux des ARNm codant pour les récepteurs D1 et D2 sont significativement augmentés dans les BO des rats transgéniques par rapport aux rats témoins à 25 mois. Or, les récepteurs D1 ont plutôt un rôle postsynaptique dans la neurotransmission alors que les récepteurs D2 vont plutôt agir au niveau présynaptique dans la neurotransmission (Hsu et al., 1995). S'il y a augmentation des récepteurs à la dopamine dans les BO des rats transgéniques il y aura augmentation de la dopamine fixée sur les récepteurs postsynaptiques provoquant une inhibition de la transmission olfactive ce qui pourrait aussi expliquer l'hyposmie.

Ainsi, l'accumulation de l' $\alpha$ -syn humaine doublement mutée dans les neurones dopaminergiques des BO provoquerait un dysfonctionnement de ces neurones. Ce

dysfonctionnement se traduisant par une baisse des taux d'ARNm de la TH et de DAT par neurones dans les BO. Les neurones lésés vont alors sécréter des facteurs qui vont stimuler la neurogénèse (corrélé par l'augmentation du taux d'ARNm du BDNF) et/ou la pousse des prolongements neuronaux (corrélée par l'augmentation du taux d'ARNm du GDNF) et/ou influencer la migration neuroblastique préférentiellement vers les BO et les diriger vers un phénotype dopaminergique. Cependant, malgré ces compensations l'organisme n'arriverait pas à restaurer l'olfaction qui décline avec l'âge de l'animal.

### **Système nigro-strié et troubles moteurs.**

La MP est avant tout caractérisée par des troubles moteurs dus à une perte massive des neurones dopaminergiques de la SNpc, nous avons donc étudié la voie nigro-striée de notre modèle. Dans la SNpc des rats transgéniques, nous observons l'expression du transgène à 25 mois. Une perte des neurones dopaminergiques de 6 % est observée mais elle n'est pas significative. Une étude a montré que seulement 5 % des neurones de la SN contiennent de la neuromélanine chez le rat (De Mattei et al., 1986) alors que chez l'Homme, 80 % des neurones de la SN contiennent de la neuromélanine. Or, ces neurones catécholaminergiques et encore plus ceux riche en neuromélanine sont excessivement sensibles au stress oxydatif. Caractéristique d'ailleurs utilisée dans les modèles toxiques (6-OHDA par exemple). Cette différence pourrait expliquer la différence de sensibilité des rats à la surexpression de l' $\alpha$ -syn humaine doublement mutée.

Cependant, malgré cette perte neuronale limitée, nous observons des symptômes neurologiques à partir de 16 mois. Nous avons noté un défaut du réflexe de placement visuel impliqué lorsque le rat est approché d'une surface à partir de 16 mois. Les rats transgéniques ont un réflexe de rétablissement des pattes postérieures, induit ou non par une perte de support, retardé par rapport aux rats sauvages dès 16 mois.

Lors des tests moteurs, les rats transgéniques ont surtout montré un léger trouble de la motricité dans le test d'entrée dans la cage à partir de 19 mois. Ce test permet d'évaluer la coordination des mouvements fins mais aussi leur initiation. Les tests du rotarod et du stepping test n'ont pas permis de montrer de troubles moteurs. Cependant, le rotarod permet de tester la coordination motrice de façon plus grossière et répétitive que le test d'entrée dans la cage. Notre modèle développe une atteinte trop légère de la SN pour développer des troubles moteurs assez importants pour être mis en évidence avec ce test. Cette observation est corrélée avec ce qui est constaté chez les patients atteints de la MP dont les premiers

symptômes moteurs n'apparaissent que lorsque 70 à 80 % des neurones dopaminergiques de la SNpc sont morts (Schapira et al., 1999).

Cependant, le comptage des cellules exprimant l' $\alpha$ -syn humaine doublement mutée dans la SN a montré une variabilité importante entre les individus (de 437 à 1067 neurones exprimant le transgène dans la SN) ce qui peut être expliqué par le fond génétique diversifié chez cette souche de rat (SPD). Cependant, nous avons pu observer que les rats transgéniques présentent un marquage TH dans la SNpc d'intensité moins forte que les rats témoins à 25 mois. Lorsque l' $\alpha$ -syn humaine doublement mutée et la TH de rat sont colocalisées dans le même neurone, la TH est plus faible que dans les neurones n'exprimant pas le transgène. Ce dysfonctionnement se traduirait par une diminution de l'intensité du marquage de la TH (baisse de synthèse de la TH) corrélée à la baisse significative du taux d'ARNm codant pour la TH dans la SN. De plus, le rat transgénique qui a le marquage TH le plus faible, est aussi celui qui exprime le plus le transgène au niveau de la SN. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l' $\alpha$ -syn humaine doublement mutée provoque un dysfonctionnement des neurones dans lesquels ce gène est exprimé. En revanche, il n'y a pas de différence de densité optique entre les rats témoins et les rats transgéniques sur les coupes de striatum traitées avec un anticorps anti-TH.

Nous observons aussi une forte diminution du taux d'ARNm codant pour le transporteur de la dopamine DAT dans la SN des rats transgéniques. La dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN débiterait par un dysfonctionnement qui conduit à une perte de phénotype TH. Elle commencerait par le corps cellulaire (diminution du taux des ARNm TH et DAT) et avec le temps atteindrait les afférences striatales. Il semblerait que le transporteur de la dopamine soit plus sensible (moins de DAT dans la SN et dans le striatum des rats transgéniques) à l'accumulation d' $\alpha$ -syn humaine doublement mutée que la TH (moins dans la SN mais stable dans le striatum des rats transgéniques) à 25 mois. La diminution du taux d'ARNm DAT suggère une diminution de la libération de dopamine au niveau du striatum (du fait d'un transport altéré). Notre modèle présenterait donc les premiers stades de la dégénérescence dopaminergique.

De plus, au niveau du striatum, nous observons une diminution significative du taux d'ARNm codant le récepteur D1 et une augmentation significative du taux d'ARNm codant le récepteur D2. Or les récepteurs D1 sont exprimés par les neurones GABAergiques/substance P de la voie directe. Une inhibition de cette voie va entraîner une activation moins importante des mouvements (inhibition de l'hyperactivité). Les récepteurs D2 sont quant à eux exprimés

par les neurones GABAergiques/enképhaline de la voie indirecte. Une activation de cette voie va provoquer une plus grande inhibition des mouvements (activation de l'hypoactivité). Ces 2 résultats vont dans le sens d'une inhibition des mouvements ce qui est observé chez les patients atteints de la MP.

Des études ont montré que le niveau de BDNF est diminué dans la SN des patients atteints de la MP (Mogi et al., 1999 ; Howells et al., 2000). Or, les taux d'ARNm codant pour les facteurs trophiques BDNF et GDNF ne sont pas modifiés par l'expression de l' $\alpha$ -syn humaine doublement mutée dans la SN de nos rats transgéniques à 25 mois. Cependant, chez l'Homme, les patients inclus dans les études avaient une MP depuis 17 ans en moyenne alors notre modèle correspondrait plus à un stade précoce de la maladie.

## LC et troubles du sommeil

Le LC est une structure impliquée dans l'alternance veille-sommeil et l'une des premières structures atteintes chez les patients. Or, notre rat présente une forte expression de l' $\alpha$ -syn humaine doublement mutée dans le LC dès 3 mois. Nous avons aussi observé la présence d'agrégats protéiques dans les neurones du LC des rats transgéniques et la quantification des neurones TH positifs dans le LC, c'est-à-dire les neurones noradrénergiques, des rats transgéniques a montré une perte non significative de 23 %. Mais cette analyse ne comprend que 5 rats transgéniques et 5 rats témoins avec une variabilité assez importante entre les différents rats testés. Il faudrait augmenter le nombre de rats dans les groupes pour affiner les résultats. Les troubles du sommeil et particulièrement du sommeil paradoxal étant au même titre que l'hyposmie, l'un des premiers symptômes observés chez les patients atteints de la MP (Chaudhuri, 2003), Il serait intéressant d'analyser les cycles du sommeil de nos animaux.

Sur les immuno-histochimies réalisées sur les coupes de LC, nous observons une forte expression du transgène dans les neurones noradrénergiques de cette structure. En revanche, nous ne sommes pas capable de détecter les transcrits (DAT, TH et  $\alpha$ -syn) dans le LC malgré une forte expression protéique. Cependant, l'analyse des transcrits du LC a été réalisée à partir d'une partie importante du tronc cérébrale (Pons) comprenant le LC et non sur du LC isolé. Or, la taille du LC est très petite par rapport à la taille du prélèvement pour notre analyse. Il est probable que les taux d'expression de ces transcrits soient « noyés » dans l'extraction total et donc ne ressortent pas lors de l'analyse en q-PCR.

Ainsi, le transgène est fortement exprimé dans les structures (BO, LC et SN) atteintes dans les premiers stades de la maladie chez l'Homme. Si l'atteinte motrice est très légère, l'apparition et le développement d'une hyposmie a bien été mise en évidence dans ce modèle ce qui colle parfaitement aux prémices de l'apparition de la pathologie humaine. Notre modèle de rat transgénique exprimant l' $\alpha$ -syn humaine doublement mutée A30P et A53T est un bon modèle de la MP dans ces stades précoces et plus particulièrement pour l'étude de la pathologie à son stade pré-symptomatique (pas encore d'apparition des symptômes moteurs).

Ces travaux ont permis par la suite d'étudier les mécanismes mis en jeu dans la MP aboutissant à 2 publications scientifiques (Annexe 1 et Annexe 2).

## Bibliographie

### A

**Agid Y et al. (1993)**, “Are dopaminergic neurons selectively vulnerable to Parkinson's disease?”, *Advances in Neurology* 60: 148-164.

**Agid Y (1991)**, “Parkinson's disease: pathophysiology”, *Lancet* 337(8753): 1321-1324.

**Alonso et al. (2006)**, “Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb”, *The Journal of Neuroscience* 26(41): 10508-10513.

### B

**Bejjani B.P et al. (1998)**, “Deep brain stimulation in Parkinson's disease: opposite effects of stimulation in the pallidum”, *Movement Disorders*, 6: 969-970.

**Benabid, A.L et al. (2009)**, “Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease”, *Lancet Neurol* 8(1): 67-81.

**Betarbet R et al. (2002)**, “Animal models of Parkinson's disease”, *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 24(4): 308-318.

**Bjorklund A et al. (2003)**, “Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease”, *Lancet Neurol* 2(7): 437-445.

**Blandini F et Armentero M.T (2012)**, “Animals models of Parkinson's disease”,

*FEBS journal* 12(279): 1156-1166

**Blond S et Siegfried J (1991)**, “Thalamic stimulation for the treatment of tremor and other movement disorders”, *Acta Neurochirurgica, Supplementum* 52: 109-111.



**Blum D et al. (2001)**, “Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease”, *Progress in Neurobiology* 65(2): 135-172.

**Bonifati Vet al. (2003)**, “Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism”, *Science* 299(5604): 256-259.

**Bowenkamp K.E et al. (1995)**, “Glial cell line-derived neurotrophic factor supports survival of injured midbrain dopaminergic neurons”, *The Journal of Comparative Neurology* 355(4): 479-489.

**Braak H et al. (2006)**, “Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology”, *Neurosci Lett* 396(1): 67-72.

**Braak H (2004)**, “Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology”, *Cell Tissue Res* 318(1): 121-134.

**Branco D et al. (2010)**, “Cross-talk between mitochondria and proteasome in Parkinson's disease pathogenesis”, *Front Aging Neurosci* 2: 17.

**Bures J, Buresova O, Huston JP (1984)**, Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior. Book Chapter, Elsevier Science Publisher.

## C

**Cambier J, Masson M (1972)**, Abrégé de neurologie. Masson et Cie.

**Chaudhuri K.R (2003)**, “Nocturnal symptom complex in PD and its management”, *Neurology* 61(6)Suppl 3: S17-23.

**Chaudhuri K.R et Schapira A.H (2009)**, “Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment”, *Lancet Neurol* 8(5): 464-474.

**Chen J.J (2010)**, “Parkinson's disease: health-related quality of life, economic cost, and implications of early treatment”, *Am J Manag Care* 16 Suppl Implications: S87-93.

**ChenQet al. (2005)**, “Alpha-synuclein alters proteasome function, protein synthesis, and stationary phase viability”, *J Biol Chem* 280(34): 30009-30017.

**Cools R (2006)**, “Dopaminergic modulation of cognitive function-implications for L-DOPA treatment in Parkinson's disease”, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 30(1): 1-23.

**Cotzias G.C (1969)**, “Parkinsonism and Dopa”, *Journal of Chronic Diseases* 22(5): 297-301.

## D

**Damier P (2002)**, “[Fluctuations]”, *Revue Neurologique* 158 (1): S85-91.

**Damier P (2002)**, “[Parkinson's disease]”, *La Revue Du Praticien* 52(11): 1255-1260.

**Dawson T.M (2000)**, “New animal models for Parkinson's disease”, *Cell* 101(2): 115-118.

**Dawson T.M et al. (2010)**, “Genetic animal models of Parkinson's disease”, *Neuron* 66(5): 646-661.

**De Lau L.M et Breteler M.M (2006)**, “Epidemiology of Parkinson's disease”, *Lancet Neurol* 5(6): 525-535.

**Delmas A (1970)**, Voies et centres nerveux, 9ème édition. Masson et Cie.

**De Mattei M et al. (1986)**, “Neuromelanin pigment in substantia nigra neurons of rats and dogs”, *Neuroscience Letters* 3(72): 37-42.

**Derkinderen P et Vidailhet M (2002)**, “[Dyskinesia caused by L-DOPA]”, *Revue Neurologique* 158(1): S92-101.

**Derkinderen P et Vidailhet M (2002)**, “[L-DOPA-induced dyskinesia]”, *Revue Neurologique* 158(122): 92-101.

**Dick F.D (2006)**, “Parkinson's disease and pesticide exposures”, *Br Med Bull* 79-80: 219-231.

**Dickson, D. W., H. Braak, et al. (2009)**, “Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria”, *Lancet Neurol* 8(12): 1150-1157.

**Doty (2007)**, “Olfaction in Parkinson's disease”, *Parkinsonism & Related Disorders* 13(3): S225-228.

**Dunnett S.B (1991)**, “Transplantation of embryonic dopamine neurons: what we know from rats”, *Journal of Neurology* 238(2): 65-74.

## E

## F

**Fahn S (Avril 2000)**, “The spectrum of levodopa-induced dyskinesias”, *Annals of Neurology* 47(4): S2-9; discussion S9-11.

**Feany M.B et Bender W.W (2000)**, “A *Drosophila* model of Parkinson's disease”, *Nature* 404(6776): 394-398.

**Freed C.R et al. (2001)**, “Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease”, *The New England Journal of Medicine* 344(10): 710-719.

## G

**Gasser T (2009)**, “Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies”, *Expert Rev Mol Med* 11: e22.

**Giasson et al. (2002)**, “Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein”, *Neuron* 34(4): 521-533.

**Gisquet-Verrier P (2006)**, “Bases structurales et anatomiques de la mémoire”, *Epilepsies* 18: 21-29.

**Gispert et al. (2003)**, “Transgenic mice expressing mutant A53T human alpha-synuclein show neuronal dysfunction in the absence of aggregate formation”, *Molecular and Cellular Neurosciences* 24(2): 419-429.

**Greten-Harrison B et al. (2010)**, “\_\_\_-Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction”, *Proc Natl Acad Sci USA* 107(45): 19573–19578.

## H

**Harrison T.R (1992)**, “Principes de médecine interne”, Tome 1 et 2, 5ème édition française, Médecine-Sciences, Flammarion.

**Harrower TP et al. (2005)**, “Lewy bodies in Parkinson's disease: protectors or perpetrators?”, *Experimental Neurology* 195(1): 1-6.

**Hawkes C.H et al. (2009)**, “Parkinson's disease: the dual hit theory revisited”, *Ann N Y Acad Sci* 1170: 615-622.

**Hornykiewicz O (Juin 1966)**, “Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function”, *Pharmacological Reviews* 18(2): 925-964.

**Howells et al. (2000)**, “Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra”, *Experimental Neurology* 166(1): 127-135.

**Hsu et al. (1995)**, “Presynaptic D2 dopaminergic receptors mediate inhibition of excitatory synaptic transmission in rat neostriatum”, *Brain Research* 690(2): 264-268.

**Huisman E et al. (2004)**, “A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease”, *Movement Disorders* 19(6): 687-692.

## I

## J

**Javoy Fet al. (1976)**, “Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system”, *Brain Res* 102(2): 201-215.

**Jonssonet Hallman (1982)**, “Modulation of 6-hydroxydopamine induced alteration of the postnatal development of central noradrenaline neurons”, *Brain Research Bulletin* 9(1-6): 635-640.

## K

**Katzenschlager R et al. (2004)**, “Mucunapruriens in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study”, *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 75(12): 1672-1677.

**Kirik D et al. (2002)**, “Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system”, *The Journal of Neuroscience* 22(7): 2780-2791.

**Kirik D et al. (2003)**, “Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease”, *Proc Natl Acad Sci USA* 100(5): 2884-2889.

**Kitada T et al. (1998)**, “Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism”, *Nature* 392(6676): 605-608.

**Kordower J.H et al. (1995)**, “Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease”, *The New England Journal of Medicine* 332(17): 1118-1124.

**Kotzbauer P.T et al. (2004)**, “Fibrillization of alpha-synuclein and tau in familial Parkinson's disease caused by the A53T alpha-synuclein mutation”, *Exp Neurol* 187(2): 279-288.

**Krack P et al. (1997)**, “Chronic stimulation of subthalamic nucleus improves levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease”, *Lancet* 350(9092): 1676.

**Kriks S et al. (2011)**, “Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease”, *Nature* 480(7378): 547-51.

**Krüger et al. (1998)**, “Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease”, *Nature Genetics* 18(2): 106-108.

## L

**Langston J.W et Ballard P.A (1983)**, “Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine”, *The New England Journal of Medicine* 309(5): 310.

**Langston J.W et al. (1999)**, “Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure”, *Ann Neurol* 46(4): 598-605.

**Le et al. (2003)**, “Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease”, *Nature Genetics* 33(1): 85-89.

**Lebouvier Tet al. (2009)**, “The second brain and Parkinson's disease”, *Eur J Neurosci* 30(5): 735-741.

**Lee M.K et al. (2002)**, “Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice”, *Proc Natl Acad Sci USA* 99(13): 8968-8973.

**Lees A.J et al. (2009)**, “Parkinson's disease”, *Lancet* 373(9680): 2055-2066.

**Lelan F et al. (2011)**, “Effects of Human Alpha-Synuclein A53T-A30P Mutations on SVZ and Local Olfactory Bulb Cell Proliferation in a Transgenic Rat Model of Parkinson Disease”, *Parkinsons Dis* 2011: 987084.

**Lemasson et al. (2005)**, “Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb”, *The Journal of Neuroscience* 25(29): 6816-6825.

**Lewis S.Jet Barker R.A (2009)**, “Understanding the dopaminergic deficits in Parkinson's disease: insights into disease heterogeneity”, *J ClinNeurosci* 16(5): 620-625.

**Limousin P et al. (1995)**, “Bilateral subthalamic nucleus stimulation for severe Parkinson's disease”, *Movement Disorders* 10(5): 672-674.

**Limousin P et al. (1997)**, “Changes in cerebral activity pattern due to subthalamic nucleus or internal pallidum stimulation in Parkinson's disease”, *Annals of Neurology* 42(3): 283-291.

**Livak K.J et Schmittgen T.D (2001)**, “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta (CT)) Method”, *Methods* 25(4):402-8.

**Lo Bianco et al. (2002)**, “alpha -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease”, *Proc Natl Acad Sci USA* 99(16): 10813-10818.

**Louvet C et al. (2004)**, “Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8+ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion”, *Transplantation* 78(9):1259-66.

**Luthman et al. (1989)**, “Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage”, *Behavioural Brain Research* 33(3): 267-277.

## M

**Madrazo I et al. (1987)**, “Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease”, *The New England Journal of Medicine* 316(14): 831-834.

**Maguire-Zeiss K A et Federoff H.J (2004)**, “Safety of viral vectors for neurological gene therapies”, *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 6(5): 473-481.

**Mandairon et al. (2006)**, “Neurogenic correlates of an olfactory discrimination task in the adult olfactory bulb”, *The European Journal of Neuroscience* 24(12): 3578-3588.

**Manyam B.V (1990)**, “Paralysis agitans and levodopa in "Ayurveda": ancient Indian medical treatise”, *Movement Disorders* 5(1): 47-48.

**Masliah E et al. (2000)**, “Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders”, *Science* 287(5456): 1265-1269.

**Marques O et Outeiro TF (2012)**, “Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death”, *Cell Death Dis* 3:e350.

**Mogi et al. (1999)**, “Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease”, *Neuroscience Letters* 270(1): 45-48.

## N

## O

**Obeso J.A et al. (2000)**, “Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease”, *Trends Neurosci* 23(10 Suppl): S8-19.

**Olanow C.W et al. (2009)**, “The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease”, *Neurology* 72(21 Suppl 4): S1-136.

## P

**Paillé V et al. (2007)**, “Rat model of Parkinson's disease with bilateral motor abnormalities, reversible with levodopa, and dyskinesias”, *Movement Disorders* 22(4): 533-539.

**Paillé V et al. (2004)**, “Role of nigral lesion in the genesis of dyskinesias in a rat model of Parkinson's disease”, *Neuroreport* 15(3): 561-564.

**Peschanski M et al. (1994)**, “Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon”, *Brain: A Journal of Neurology* 117(Pt 3): 487-499.

**Pollak P et al. (1996)**, “Treatment of Parkinson's disease. New surgical treatment strategies”, *European Neurology* 36(6): 400-404.

**Polymeropoulos et al. (1997)**, “Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease”, *Science* 276(5321): 2045-2047.



## R

**Richfield E.K et al. (2002)**, “Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice”, *Exp Neurol* 175(1): 35-48.

**Royal et Key(1999)**, “Development of P2 olfactory glomeruli in P2-internal ribosome entry site-tau-LacZ transgenic mice”, *The Journal of Neuroscience* 19(22): 9856-9864.

**Rodriguez-Oroz M.C et al. (2009)**, “Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms”, *Lancet Neurol* 8(12): 1128-1139.

## S

**Sachs et Jonsson (1975)**, “Effects of 6-hydroxydopamine on central noradrenaline neurons during ontogeny”, *Brain Research* 99(2): 277-291.

**Schallert T et al. (1979)**, “Excessive bracing reactions and their control by atropine and L-Dopa in animal analog of Parkinsonism”, *Exp Neurol* 64: 33-43

**Schapira A.H (1999)**, “Science, medicine, and the future: Parkinson's disease”, *BMJ* 318(7179): 311-314.

**Singleton et al. (2003)**, “alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease”, *Science* 302(5646): 841.

**Steece-Collier K et al. (2002)**, “Etiology of Parkinson's disease: Genetics and environment revisited”, *Proc Natl Acad Sci USA* 99(22): 13972-13974.

## T

**Tasker R.R et al. (1997)**, “Pallidal and thalamic surgery for Parkinson's disease”, *Experimental Neurology* 144(1): 35-40.

**Tolosa E et al. (2007)**, “The premotor phase of Parkinson's disease”, *Parkinsonism Relat Disord* 13: S2-7.

## U

**Ungerstedt U (1968)**, “6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons”, *European Journal of Pharmacology* 5(1): 107-110.

**Ungerstedt U (1976)**, “6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine pathway: the turning syndrome”, *Pharmacology & Therapeutics. Part B: General & Systematic Pharmacology* 2(1): 37-40.

## V

**Valente et al. (2004)**, “PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism”, *Annals of Neurology* 56(3): 336-341.

## W

**Winkler C et al. (2002)**, “L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxy-dopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function”, *Neurobiology of Disease* 10(2): 165-186.

**Winner B et al. (2008)**, “Mutant alpha-synuclein exacerbates age-related decrease of neurogenesis”, *Neurobiology of Aging* 29(6): 913-925.

**Winner B et al. (2006)**, “Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb”, *Experimental Neurology* 197(1): 113-121.

**Wolters, E. (2009)**, “Non-motor extranigral signs and symptoms in Parkinson's disease”, *Parkinsonism Relat Disord* 15(3): S6-12.

## Y

## Z

**Zarranz J.J et al. (2004)**, “The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia”, *Annals of Neurology* 55(2): 164-173.

**Ziemssen T et Reichmann H (2007)**, “Non-motor dysfunction in Parkinson's disease”, *Parkinsonism Relat Disord* 13(6): 323-332.

**Zou D.J et al. (2009)**, “How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story?”, *Nat Rev Neurosci* 10(8): 611-618.